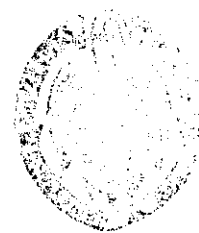


**REPERCUSION
METABOLICA Y CINETICA
DE DIFUSION DE AGENTES
CRIOPROTECTORES A
TRAVES DEL CARTILAGO
ARTICULAR HUMANO.**

**ESTUDIO MEDIANTE TÉCNICAS
DE RMN.**

**TESIS DOCTORAL
BELEN CARSI LLUCH
SERVICIO COT
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA**



ARCHIVO



* 5 3 0 9 8 3 7 2 6 6 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

• JUSTIFICACION

El cartílago es un tejido conectivo denso que actúa como material de soporte y transmisión de las cargas en las articulaciones sinoviales dotándolas de una superficie lisa y óptima para la congruencia de las superficies articulares.

Cuando los avances en el tratamiento de los tumores musculoesqueléticos aumentan la demanda de injertos osteocondrales complejos, los grandes traumatizados se recuperan de sus lesiones hasta el punto de requerir superficies articulares útiles para reincorporarse a su vida diaria y las necrosis óseas y la patología artrósica exigen soluciones que vayan más allá de la sustitución protésica, con una expectativa limitada de duración, se delimita cada vez más clara e imperiosamente la necesidad de una solución biológica a la patología articular.

El cartílago articular posee un potencial de regeneración muy limitado (MITCHELL Y COLS. , 1976; FURUKAWA Y COL. , 1980; MANKIN, 1982; SALTER Y COL. , 1980). Los procedimientos que implican la resección de las superficies articulares dañadas con implantes artificiales poseen buenos resultados a corto plazo pero tienen importantes limitaciones, debidas sobre todo a la falta de propiedades biomecánicas (MOW Y MAK, 1987; BUCKWALTER Y COL. , 1990), y a la duración limitada de los implantes en comparación con el cartílago articular, que deriva sobre todo de la fijación de las prótesis al hueso del paciente (CHANDLER Y COLS. , 1981; TSAO Y COLS. , 1993; SALVATI Y COLS. , 1994; HERNANDEZ Y COLS. , 1994), además de otras complicaciones como infección, inestabilidad articular,

fractura del hueso o fatiga del implante (BOURNE Y COLS. , 1984; CANNER Y COLS. , 1984; HAVELIN Y COLS. , 1994; CALLAGHAN, 1994; BLASER Y MATTHEWS, 1994; SHAW Y GREER, 1994).

La necesidad de hallar un método capaz de producir una cobertura biológica de las lesiones condrales justifica el interés generado por otras modalidades de tratamiento, basadas en la utilización de aloinjertos osteocondrales o injertos procedentes de otros tejidos blandos que puedan sustituir al cartílago en su función (constituyendo las denominadas “artroplastias de interposición”), como fascia, músculo, tendones, periostio o pericondrio. Estas últimas técnicas constituyen un intento de producir una nueva población de células capaces de imitar al tejido condral. Los resultados de estas técnicas son muy variables y dependen de multitud de factores (ENGKVIST Y OHLSEN, 1980; O'DRISCOLL Y COLS. , 1988; ZARNETT Y SALTER, 1989; BUCKWALTER Y MOW, 1992). La variabilidad de los resultados obtenidos con estas terapéuticas hace difícil su indicación.

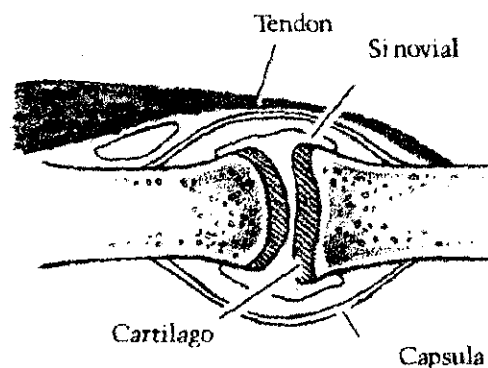
Otros procedimientos que intentan estimular la restauración de la superficie articular dañada quedan incluidos todavía en lo que podemos denominar “tratamientos experimentales”. Aquí se incluyen la implantación intraarticular de factores de crecimiento, células y matrices artificiales (SPEER Y COL. , 1979; ASTON Y COL. , 1986; ITAY Y COL. , 1987; DAHLBERG Y KREICBERGS, 1991; CAPLAN Y COL. , 1992; HUNZINGER Y ROSENBERG, 1994; WAKITANI Y COL, 1994). Esta línea terapéutica está basada en los resultados satisfactorios obtenidos en la restauración de defectos agudos creados artificialmente en las articulaciones de animales de experimentación, lo que no implica necesariamente resultados extrapolables a las articulaciones

• CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS Y FUNCIONALES DEL CARTILAGO ARTICULAR

El cartílago es un tejido avascular, aneural y alinfático, de actividad metabólica reducida y compuesto por células (condrocitos) y macromoléculas estructurales (fibras y matriz amorfa), con un claro predominio de este segundo componente. Dependiendo de su composición, se distinguen tres clases de cartílago:

1. Fibrocartílago; predominio del componente fibrilar colágeno y localizado en meniscos, anillo intervertebral, rodetes acetabulares y tejido de reparación de la superficie articular, así como en las articulaciones denominadas anfiartrosis (FIG. 2 A).
2. Cartílago elástico: gran cantidad de fibras elásticas, y localizado en pabellón auricular, epiglotis, cartílagos laríngeos, etc. (FIG. 2 B).
3. Cartílago hialino: traslúcido y de coloración blanquecina se localiza en extremos articulares, esqueleto fetal, placa de crecimiento, parrilla costal, y es el componente fundamental de las articulaciones sinoviales o diartrosis (FIG. 2 C).

FIG. 1. Representación esquemática de una articulación sinovial.



humanas. Hasta el momento, ninguno de estas aproximaciones al problema, aunque prometedoras, ha conseguido un tejido que duplique la estructura, composición, propiedades mecánicas y duración del cartílago articular normal.

Los aloinjertos en fresco, con los que se han conseguido buenos resultados clínicos (McDERMOTT Y COL. , 1985; GROSS Y COL. , 1992; FLYNN Y COLS. , 1994), plantean importantes problemas de disponibilidad debido a la dificultad de coordinar la extracción y el implante de injerto.

El almacenamiento durante períodos suficientemente largos es, por el momento, la única estrategia que puede asegurar una disponibilidad de tejido donante adecuada y segura, dado el tiempo que se requiere para comprobar la ausencia de enfermedades infecciosas en la pieza y la necesidad de adecuar las características específicas de tamaño, forma, grosor, etc. (LOCHT Y COL. 1984; MEYERS, 1985; McDERMOTT Y COL. , 1985; OAKESHOTT Y COL. , 1988; MEYERS Y COL. , 1989). La conquista de este tiempo se hace fundamentalmente a través de la criopreservación (FAHY, 1991).

La criopreservación (literalmente "conservar o mantener la integridad mediante el frío") hace indefinido el tiempo de almacenamiento al detener el tiempo biológico pero se enfrenta al problema del enfriamiento hasta temperaturas criogénicas y calentamiento posterior con el mínimo daño posible del órgano o tejido.

Los estudios sobre la criopreservación de la estructura y función de diversos tejidos y órganos se han individualizado y perfeccionado (FAHY Y COLS. , 1991; KHIRABADI Y COLS. , 1992; OKOUCHI Y COLS. , 1993). Así, existen actualmente protocolos para la creación de un Banco de Huesos y distintos métodos para almacenar el tejido óseo durante varios años (AATB,

1984; TOMFORD Y COLS. , 1983). En nuestro centro hospitalario, la creación del banco de huesos data de 1984 (LOPEZ-DURAN, 1985) y su protocolización (FERNANDEZ FERNANDEZ-ARROYO Y COLS. , 1989) permite una utilización en la práctica clínica diaria. Sin embargo, el diseño de los protocolos de criopreservación del cartílago articular para su transplante se encuentra todavía en fase experimental.

El mantenimiento de la viabilidad condrocítica aparece como uno de los condicionamientos principales para asegurar las propiedades biomecánicas del injerto de cartílago articular a largo plazo (McGANN Y COLS. , 1987; HURTIG Y COLS. , 1992; MULDREW Y COLS. , 1993) y numerosos estudios demuestran que la viabilidad máxima se obtiene con protocolos de crioconservación de ritmo y temperatura controlados y con el uso de agentes crioprotectores (TOMFORD Y COLS. , 1985; McGANN Y COLS. , 1993; LOPEZ-OLIVA Y COLS. , 1994) aunque los resultados distan mucho todavía para resultar alentadores en la práctica clínica.

Uno de los problemas fundamentales en la criopreservación del cartílago articular es la dificultad de encontrar un modelo físico que permita predecir el comportamiento del cartílago ante la lesión crioinducida. La hipótesis de trabajo inicial que equiparaba la matriz cartilaginosa (que está constituida en un 80% por agua) a una solución ideal en la que los condrocitos se encuentran suspendidos en disolución no es válida (MULDREW Y COL. , 1990). Existe una interacción entre las células y la matriz que las rodea que hace que la viabilidad celular tras la congelación varíe desde más de un 90% para los condrocitos aislados (TOMFORD Y COL. , 1981) a un 30-50% para el cartílago intacto (SCHACHAR Y COL. , 1986; LOPEZ-OLIVA Y COL. , 1995).

Estos resultados obligan a la introducción de más variables a considerar en los protocolos de crioconservación de piezas articulares de cartílago intacto. Además del daño celular producido por el gradiente de presión osmótica creado a ambos lados de la membrana celular y el resultante flujo de agua desde el interior hacia la solución hipertónica extracelular (MULDREW Y COL. , 1990); hay que considerar la capacidad del agente crioprotector para penetrar a través de la matriz extracelular y actuar durante el tiempo y a la concentración suficientes como para hacer efectiva su función crioprotectora. El hecho, experimentalmente comprobado (MULDREW Y COL. , 1992), de que sean los condrocitos pertenecientes a la capa intermedia los más dañados durante la congelación y descongelación de piezas de cartílago sometidas a protocolos optimizados de criopreservación (velocidad de enfriamiento de 1°C/min, exposición previa a DMSO al 15% durante 1 hora) hace teorizar dos explicaciones posibles:

1. Las capas morfológicas en las que se divide el cartílago articular indican diferencias en estructura y función de los condrocitos que las componen, siendo una de ellas la diferente susceptibilidad a la acción de los agentes crioprotectores, son así los condrocitos de la capa intermedia más sensibles a la lesión crioinducida (McGANN Y COL. , 1993).
2. El agente crioprotector no difunde homogéneamente a través del cartílago y su velocidad de penetración es insuficiente para atravesar íntegramente su espesor, por lo que los protocolos actuales de criopreservación no permiten la exposición de la totalidad de las

células a su acción beneficiosa. Dado que la pieza de cartílago se sumerge en la solución preparada, las capas superficial y profunda quedan en contacto directo con el agente; no sucediendo lo mismo con la capa intermedia.

El objetivo de nuestro estudio es medir la habilidad de los agentes crioprotectores más utilizados en la práctica ortopédica para difundir a través del cartílago articular humano usando técnicas de RMN. Para ello hemos estudiado:

1. Los coeficientes de autodifusión del DMSO y del glicerol.
2. La velocidad de penetración de dichas sustancias a través del cartílago articular.
3. La influencia en la difusión de la variación de la temperatura y la concentración del agente crioprotector.

Con todo ello hemos optimizado la técnica para el estudio in vitro de otras sustancias que en el futuro puedan ser utilizadas para la crioprotección, con miras a su posible aplicación in vivo, abriendo nuevos horizontes con el fin de aumentar la viabilidad condrocítica tras la congelación y descongelación y añadiendo perspectivas nuevas como la monitorización de la penetración de sustancias, distintas a crioprotectores, a través del cartílago.

Completamos nuestra investigación sobre la acción de crioprotectores en el cartílago humano con el estudio de la alteración metabólica que supone la exposición de los condrocitos a los agentes crioprotectores, ya sea incluidos en

su matriz o aislados y en cultivo. Utilizamos para ello la espectroscopía de ^{31}P , herramienta de utilidad comprobada en los estudios metabólicos in vivo de otros tejidos del organismo (COHEN Y COLS. , 1983; MORRIS, 1988; DALY Y COHEN, 1989). A pesar de la amplia literatura sobre las aplicaciones de esta técnica, encontramos un relativo "vacío bibliográfico" en cuanto a su utilización sobre el cartílago articular. Sin embargo, creemos que la optimización de esta técnica para el estudio de piezas condrales hará posible la definición de parámetros que nos permitan estudiar la calidad biológica de un injerto de cartílago antes de proceder a su utilización como implante.

Una de las principales líneas de investigación de nuestro servicio está representada así por el estudio de los fenómenos que ocurren a nivel óseo y condral tras la crioconservación y transplante sucesivo, y esta tesis representa la continuación a los estudios sobre auto y aloinjertos en fresco y crioconservados en animales de experimentación (MARCO, 1990) y a la optimización de los protocolos de criopreservación en el cartílago humano (LOPEZ-OLIVA, 1993), intentando estudiar los procesos de difusión de los agentes crioprotectores en piezas de cartílago intacto y la repercusión metabólica de estas sustancias químicas sobre el metabolismo celular. Para ello, hemos utilizado técnicas de resonancia magnética nuclear, no sólo por las ventajas metodológicas sino por su aplicabilidad a los estudios in vivo.

La elaboración de este estudio ha sido posible gracias a la financiación de la beca del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (protocolo FIS 95/0483), a la inestimable colaboración del personal y facilidades del Instituto Pluridisciplinar de la Universidad Complutense de Madrid.

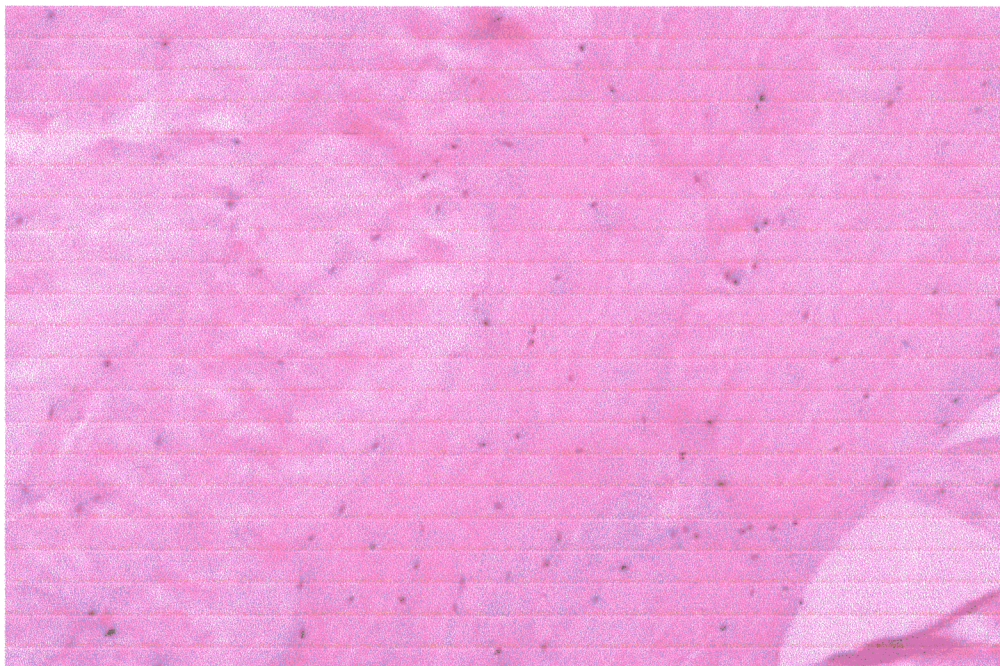
La estructura característica del cartílago hialino es crucial para la función de las articulaciones sinoviales. Permite la transmisión de altas cargas manteniendo el esfuerzo de contacto a bajo nivel y un movimiento con baja resistencia a la fricción.

La función del cartílago depende de las peculiares propiedades físico-mecánicas de su sustancia intercelular, la matriz, y a su vez de las células que lo forman; los condrocitos.

FIG.2.

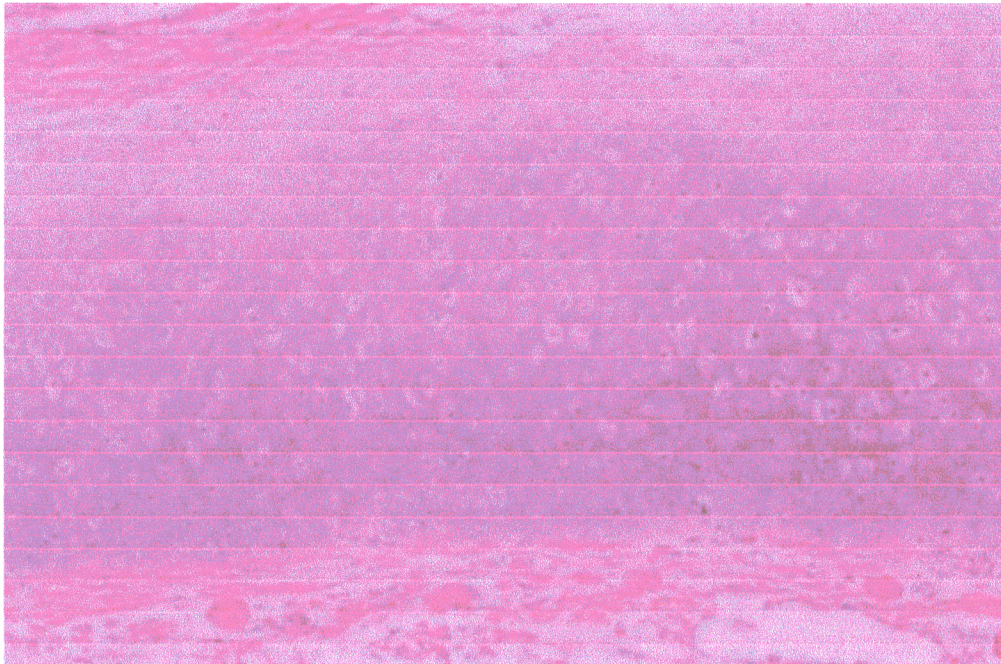
A. Fibrocartílago, con abundancia de componente fibroso (colágeno).

Disco intervertebral, con tinción de hematoxilina-eosina, sección en parafina, 100x.



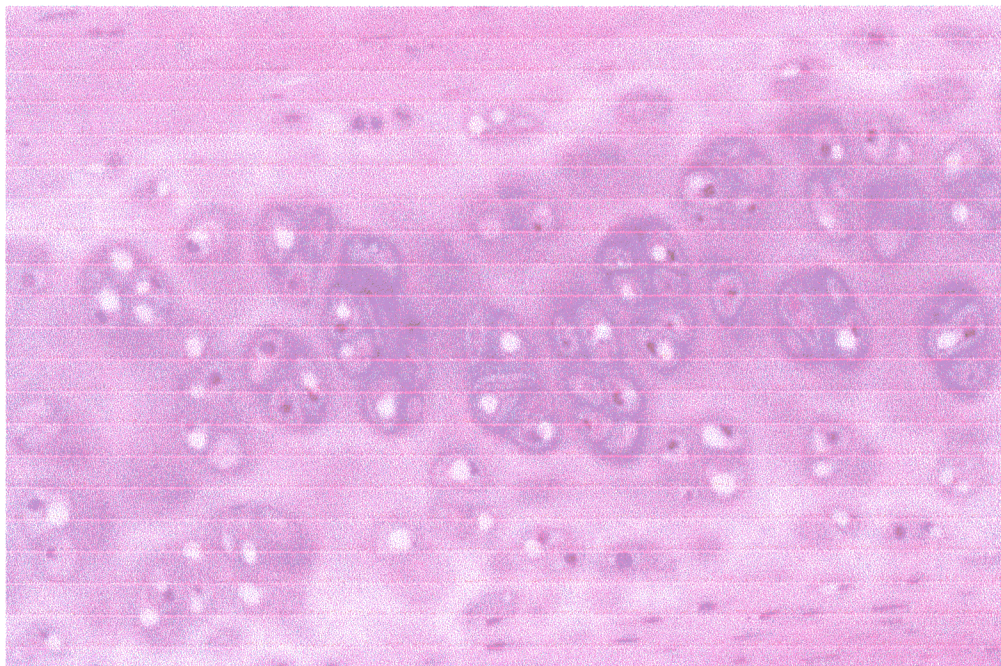
B. Cartílago elástico, con menos matriz intercelular que el cartílago articular.

Epiglotis, hematoxilina-eosina, sección plástica 1.5 micras, 100x.



C. Cartílago hialino, con numerosos condrocitos agrupados en grupos isogénicos.

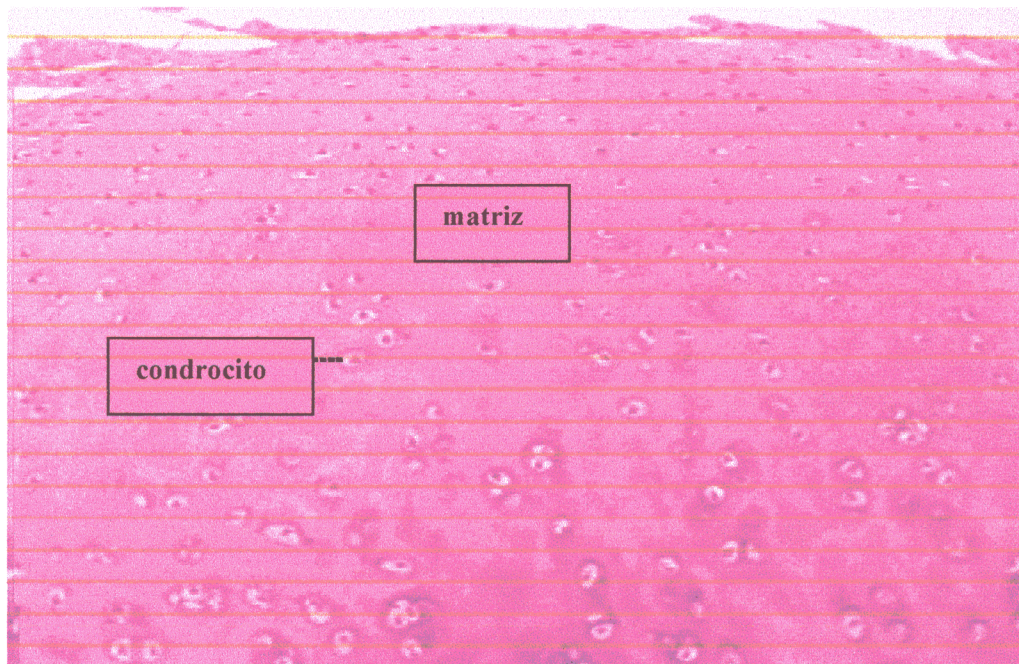
Articulación sinovial, H-E, sección en parafina, 100x.



COMPOSICIÓN DEL CARTILAGO HIALINO

El cartílago articular no posee nervios y es generalmente considerado avascular, aunque algunos vasos sanguíneos pueden hallarse en su zona más profunda junto al hueso. El tejido consiste, en síntesis, en un número relativamente escaso de células y una abundante sustancia intercelular.

FIG.3.



Aunque las células y la matriz se describan separadas son funcionalmente interdependientes. La actividad de los condrocitos es necesaria para la síntesis de la matriz y probablemente para su degradación fisiológica (MANKIN Y LIPIELLO, 1969). A cambio, la matriz juega un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis celular (GERSH Y CATCHPOLE, 1960). En relación con el peso húmedo del tejido, se calcula que el componente predominante es el agua (60-80 %), seguido de la matriz amorfa (20-40 %) y componente celular (5-10 %).

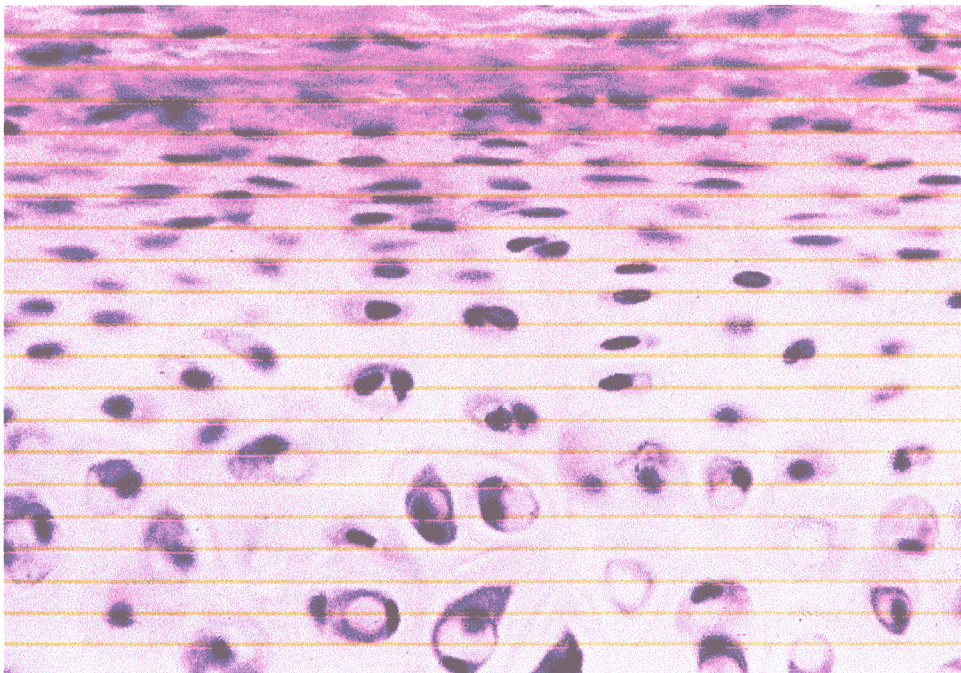
MATRIZ EXTRACELULAR O AMORFA

La matriz del cartílago articular es un tejido conectivo especializado que consiste fundamentalmente en un gel de proteoglicanos hidratados reforzado por una malla tridimensional de fibras de colágeno, composición adaptada especialmente a la función doble de articular la superficie con una fricción baja y transmitir cargas a través de la articulación hacia el hueso subcondral.

La matriz extracelular está compuesta fundamentalmente por una mezcla de colágeno (fundamentalmente colágeno tipo II, a diferencia de otros tipos de tejido del sistema musculoesquelético y que permite identificarlo y diferenciarlo de ellos en estudios in vitro e in vivo -O'DRISCOLL Y COLS. , 1995-) y agregados de proteoglicanos, con cantidades más pequeñas de otros tipos de colágeno, proteínas y glicoproteínas, en unas proporciones aproximadas de 50%, 30-35% y 15-20% del peso seco del tejido respectivamente (MANKIN Y COLS, 1994). En el cartílago articular normal, la malla de colágeno posee una estructura bien definida que determina la resistencia y fuerza tensional en cada capa del cartílago (BUCKWALTER Y MOW, 1992). Dado que el colágeno y los proteoglicanos forman un material compuesto por fibras reforzadas, la malla colágena es responsable también de la resistencia al cizallamiento del tejido.

La textura de la capa superficial del cartílago articular normal es relativamente lisa y compuesta por láminas de colágeno firmemente entrelazadas (MEACHIM Y ROY, 1969; GHADIALLY, 1983; SCHENK Y COLS. , 1986). Su superficie es acelular, la *lámina splendens*, bajo la que se agrupan numerosos condrocitos alargados.

FIG.4.



Teniendo en cuenta además esta diferente distribución celular, se aceptan las siguientes zonas o estratos paralelos a la superficie (COLLINS, 1949; McCALL, 1969):

- Zona I o superficial: adyacente a la cavidad articular con fibras ordenadas tangencialmente a la superficie. Sus células son discoidales cuyo eje mayor es también paralelo a la superficie. Es la capa más delgada (40 micras) y muestra escasa actividad metabólica.
- Zona II, transicional o intermedia: Menor densidad de células de mayor esfericidad incluidas en una malla de fibras no orientadas. Tiene un espesor de 500 micras y sus células presentan mayor actividad metabólica.

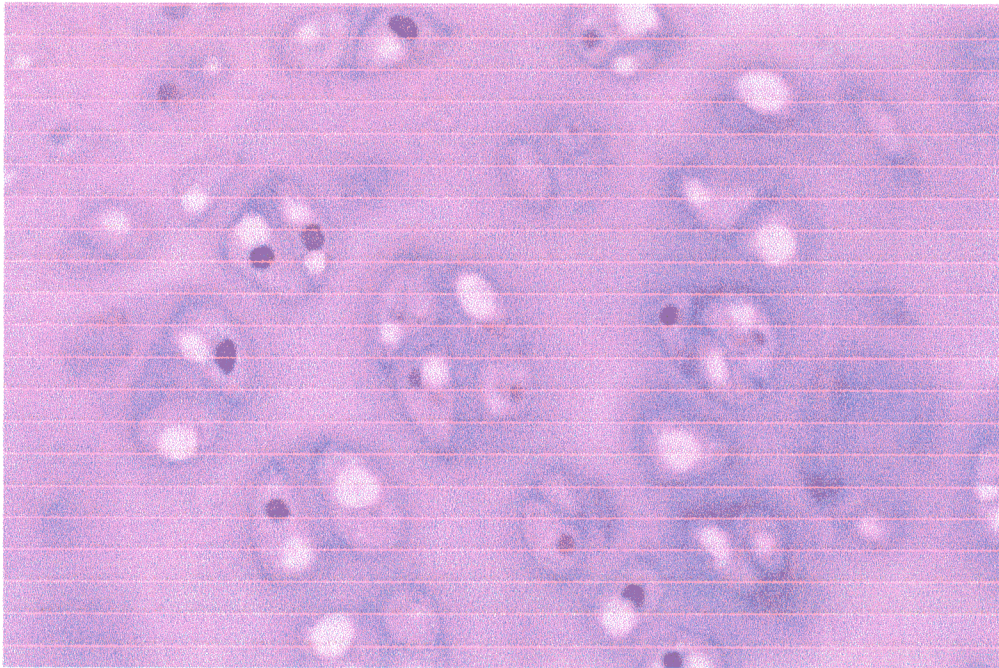
- Zona III, profunda o radial: La red de fibras está apretada y con una disposición preferentemente perpendicular o radial a la superficie articular. Las células esféricas se disponen en grupos columnares de 4 a 8 elementos.
- Zona IV o calcificada: Adyacente al hueso subcondral y separada de las anteriores por una limitante basófila (FAWNS Y LANDELLS, 1953) denominada en inglés "tide mark" por su semejanza a la huella de la marea y cuya estructura fue descrita por REDLER Y COL. en 1975. Esta limitante diferencia las capas anteriores, no calcificadas, de ésta y posee una importante función en el control del progreso de la calcificación y por tanto, el mantenimiento de la forma del extremo óseo (BULLOUGH Y JAGANNATH, 1983).

Aunque el espesor relativo de cada zona varía mucho con cada articulación, en todas ellas podemos diferenciar siempre en la matriz dos zonas; la adyacente al condrocito o matriz pericelular y el resto, denominado matriz intercelular. La matriz pericelular tiene escasas o nulas fibras colágenas y abundancia de proteoglicanos y proteínas no colágenas (como condronectina o ancorina CII -BIDANSET Y COLS, 1992). La matriz intercelular posee la organización característica que dota a este tejido de sus propiedades biomecánicas (MEACHIM Y ROY, 1967).

FIG.5.

Detalle de los grupos isogénicos de condrocitos incluidos en sus lagunas y rodeados de matriz pericelular.

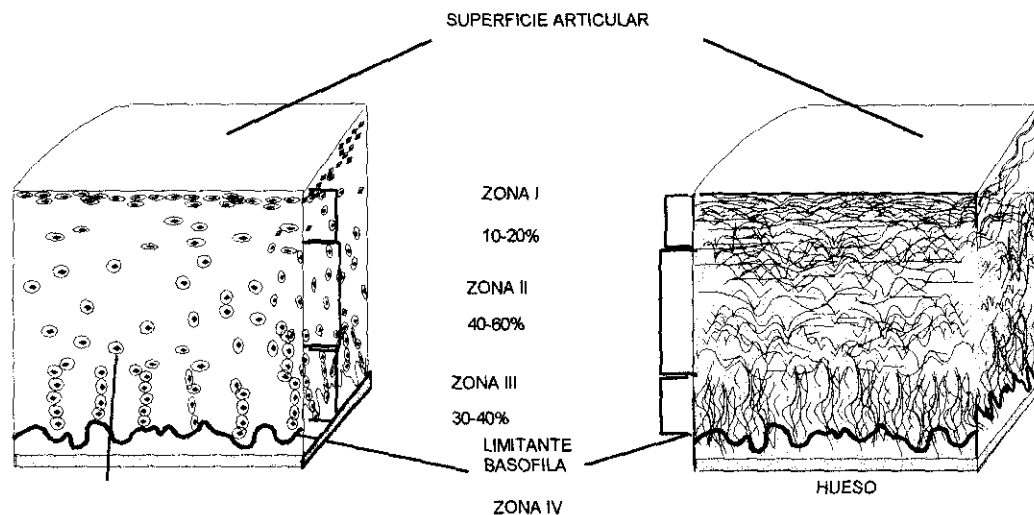
H-E, sección plástica 1.5 micras, 400x.



En definitiva, parece que la arquitectura interna del cartílago articular obedece a una adaptación funcional: la capa superficial proporciona resistencia al cizallamiento, y la zona de transición permite modificar la orientación estructural para asegurar en la zona radial la resistencia y amortiguación de las compresiones (KEMPSON Y COL; 1973). La capa calcificada garantiza la transición gradual hacia la mayor rigidez del tejido óseo subcondral, así como una fijación firme del cartílago al hueso. Esta funcionalidad podría tener cierta analogía con la clásica descripción de las arcadas de BENNINGHOFF (1925).

FIG.6.

Estructura del cartílago articular. Izquierda; distribución de los condrocitos en un esquema de un corte histológico. Derecha; distribución esquemática de la arquitectura de fibras de colágeno.



En el cartílago articular normal, numerosas moléculas de proteínas y polisacáridos (proteoglicanos) se unen a una cadena de ácido hialurónico, siendo este enlace estabilizado por otra proteína de unión distinta. Los proteoglicanos están inmovilizados dentro de la malla colágena lo que produce una matriz fuerte y sólida (MUIR, 1983). Una molécula de proteoglicano está formada por muchas cadenas de glicosaminoglicanos (queratán sulfato y condroitín sulfato) unidas a la proteína central o retículo proteico. Los glicosaminoglicanos contienen a su vez numerosas cadenas de grupos carboxilo y sulfato cargados eléctricamente. Todo ello contribuye a la presión hidrostática del tejido, que tiene una importancia fundamental pues la hidratación del cartílago y sus propiedades de deformación y recuperación están directamente relacionadas (MOW Y COLS, 1992).

FIG.7. Microscopía electrónica de fibras colágenas procedentes de cartílago articular.

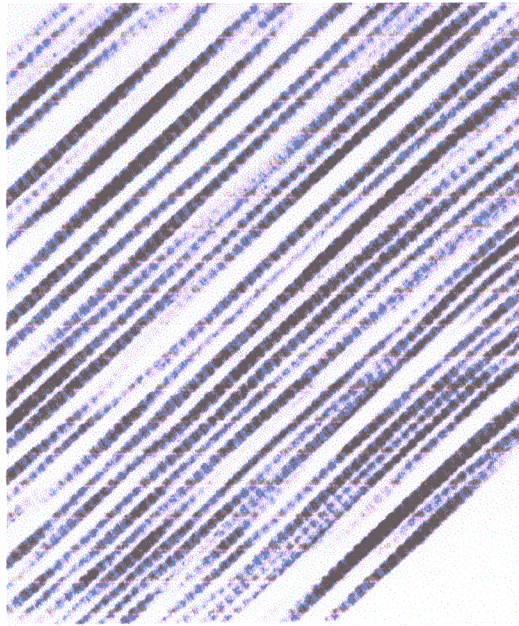
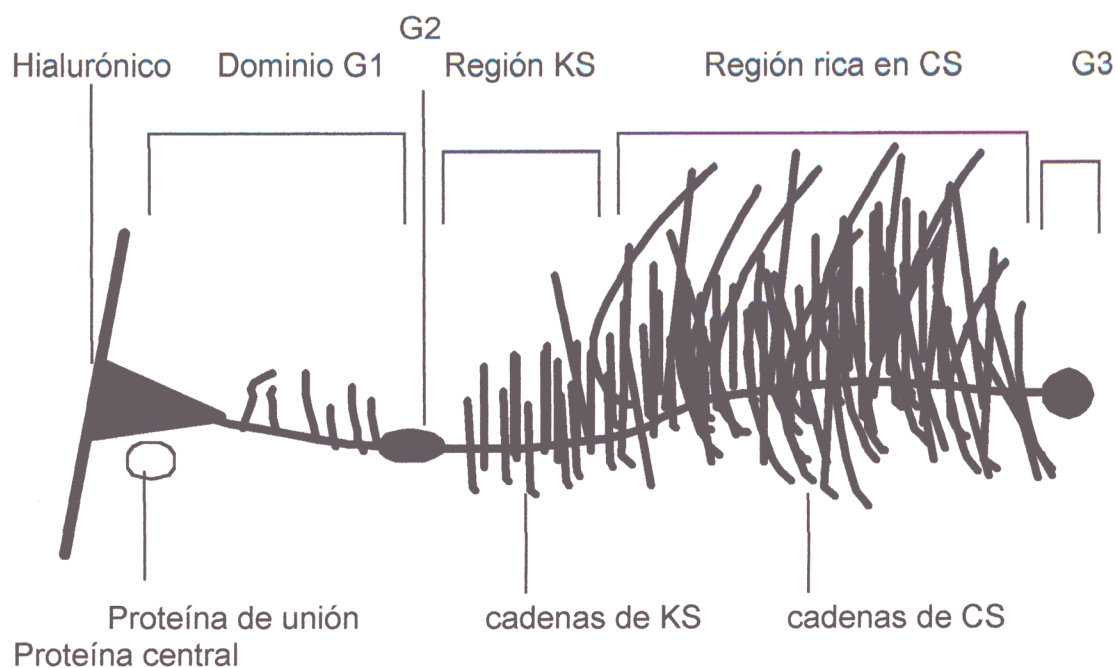


Diagrama de una molécula de proteoglicano.



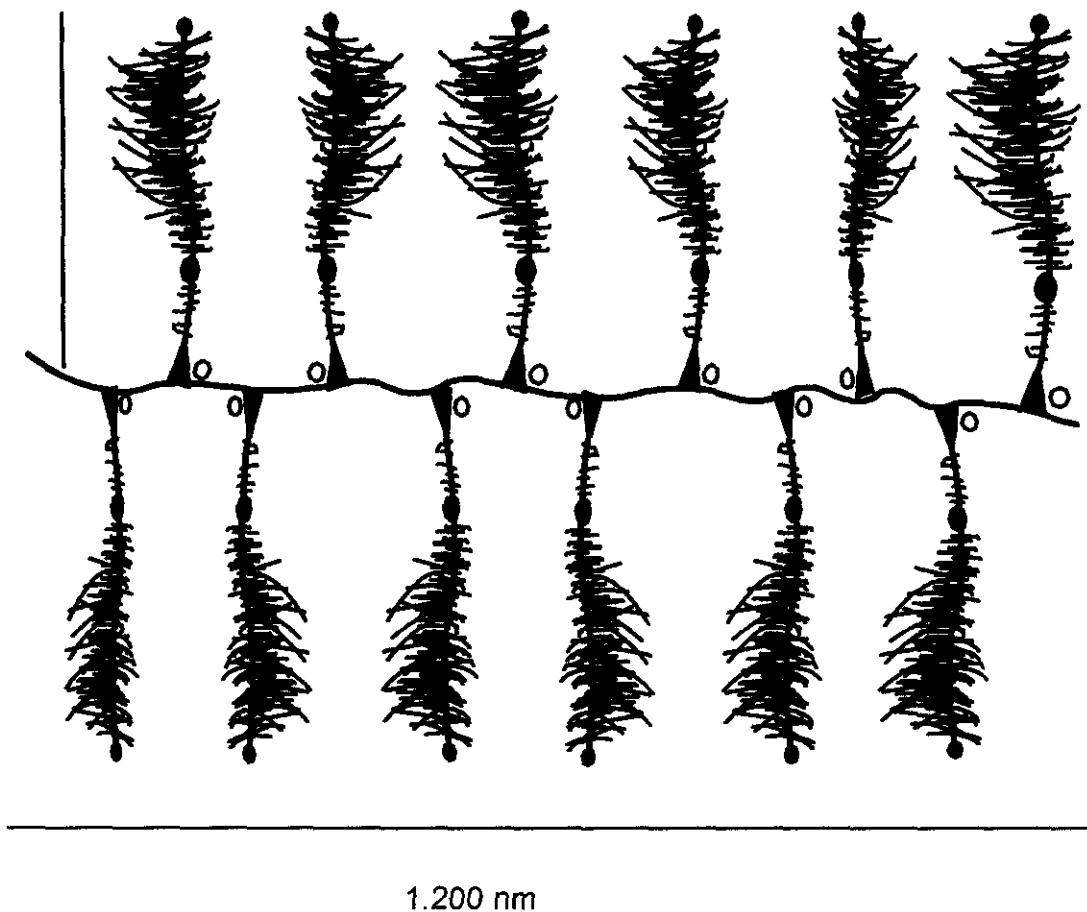
La proteína central posee varios dominios globulares (G1, G2 y G3) que se corresponden con la unión al hialurónico (G1), el segundo dominio globular

(G2) y el dominio del extremo C-terminal (G3). El dominio N-terminal G1 es capaz de unirse específicamente al ácido hialurónico, siendo estabilizada por la proteína de unión. El peso molecular total de una molécula de proteoglicano varía entre 0.5 y 1.0 millón de daltons (ROSEMONT, 1994).

FIG.8.

Representación esquemática de un proteoglicano, constituido por una molécula central ramificada a la que se unen muchas cadenas laterales de glicosaminoglicanos.

200-400nm



La longitud de la cadena de ác. hialurónico determina el tamaño del proteoglicano. El peso molecular total puede alcanzar los 200 millones de daltons en el cartílago inmaduro; en el cartílago adulto y en el del anciano, el

proteoglicano disminuye progresivamente su tamaño (ROSEMONT, 1994). Del mismo modo, el contenido y tamaño de los proteoglicanos varía con la zona del cartílago estudiada. Así, en las áreas que soportan las mayores cargas de la articulación encontramos una concentración de proteoglicanos más alta que en las áreas sometidas a menor carga (SWEET Y COLS. , 1977; MANICOURT Y COLS. , 1991).

Estudios experimentales con anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al queratán sulfato (MZ15), demuestran que la distribución de éste en el cartílago articular no es homogénea, aumentando su cantidad de forma proporcional al aumento de la distancia a la superficie articular. Este anticuerpo permite reconocer dos subtipos de condrocitos: negativos para antígenos de superficie de queratán sulfato, localizados en las capas superficiales; y, positivos, localizados en sus capas más profundas (ZANETTI, Y COLS, 1985).

Los proteoglicanos cuya estructura ha sido descrita son los que predominan en el cartílago articular, denominados proteoglicanos agregantes, aunque existen otros, en menor cuantía, denominados proteoglicanos no agregantes, que son más pequeños y poseen sólo una clase de glicosaminoglicano, el condroitín sulfato, que suele encontrarse en forma de dermatán sulfato, con algunos residuos de glucuronato unidos a iduronato. (ROSENBERG Y COLS. , 1985). Los proteoglicanos agregantes dotan al tejido de sus potentes propiedades elásticas. Los proteoglicanos no agregantes parecen tener múltiples funciones, pues se unen al colágeno, fibronectina y otras macromoléculas regulando sus funciones biológicas (ROSENBERG, 1991). Dentro de la matriz colágena distinguimos, pues, dos tipos

fundamentales de proteoglicanos: los agregantes o agreganos y los no agregantes, cuya proporción es menor del 5% de peso en seco de la matriz. Los proteoglicanos agregantes (que incluyen fibronectina, laminina, vitronectina, fibrinógeno y colágeno tipo IX) participan en los procesos de adhesión celular a los sustratos a través de proteínas receptoras de membrana específicas denominadas integrinas, a diferencia de los proteoglicanos no agregantes (trombospondina, tenascina, SPARC y dos clases del proteoglicano dermatán sulfato recientemente descritas: tipo I o biglicano y tipo II o decorina - ROSENBERG Y COLS. , 1985-) que parecen inhibir las fases iniciales de la adhesión celular mediante enlaces covalentes con la fibronectina. El conocimiento de esta diferencia tiene una proyección en la práctica clínica inmediata: solucionar los problemas de unión entre la porción condral de los aloinjertos osteocondrales al cartílago receptor (ASTON Y BENTLEY, 1986; MALININ Y COLS. , 1985; MARCO, 1990) mediante la adición de sustancias estimuladoras de la adhesión celular como el heparán sulfato (HEREMANS Y COLS. 1990), la fibronectina (WEST, LANZA, ROSENBLOOM Y COLS. , 1979), el ácido retinoico (BENYA Y PADILLA, 1986) y las citocalasinas B y D (ROSEN Y COLS. , 1986) o inhibición de los inhibidores con sustancias como la proteína central de los propios proteoglicanos del dermatán sulfato (BIDANSET Y COLS. , 1992), la vimentina (BEN-ZE'EV, 1984) y colchicina (BROWN Y BENYA, 1988). El estudio de los efectos de estas sustancias en los cultivos de condrocitos ha llevado a la hipótesis de una trasducción entre la forma celular y el genoma celular a través del estado de organización de los microtúbulos (BENYA Y COLS, 1988). La fibronectina parece ser la más directa responsable de los fenómenos de

adhesión celular. SHIOZAWA Y COLS. (1992) demuestran esta propiedad al estimular la adhesión de la invasión del pannus mediante el tratamiento de la superficie articular con hialuronidasa, que elimina los proteoglicanos superficiales del cartílago. Además, el recubrimiento de las superficies tratadas con componentes de los proteoglicanos, como el ácido hialurónico y el condroitín sulfato, inhibe el proceso de invasión del sinovio reumatoide mientras que los fenómenos de adhesión son estimulados por la adición de fibronectina. La porción adhesiva de la molécula que inhibe específicamente la unión de la fibronectina a las células es un péptido compuesto por Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro, puesto que al añadir un péptido sintético idéntico se inhiben los procesos de adhesión celular.

TABLA.1.

Extensión del sinovio reumatoide sobre superficies tratadas con hialuronidasa.

Experimentos	1	2	3
sin fibronectina	1.60	1.50	1.38
sin fibronectina con inmunocomplejos	0.40	0.21	0.12
con fibronectina y proteoglicanos	0.42	0.01	0.51

distancia A / B

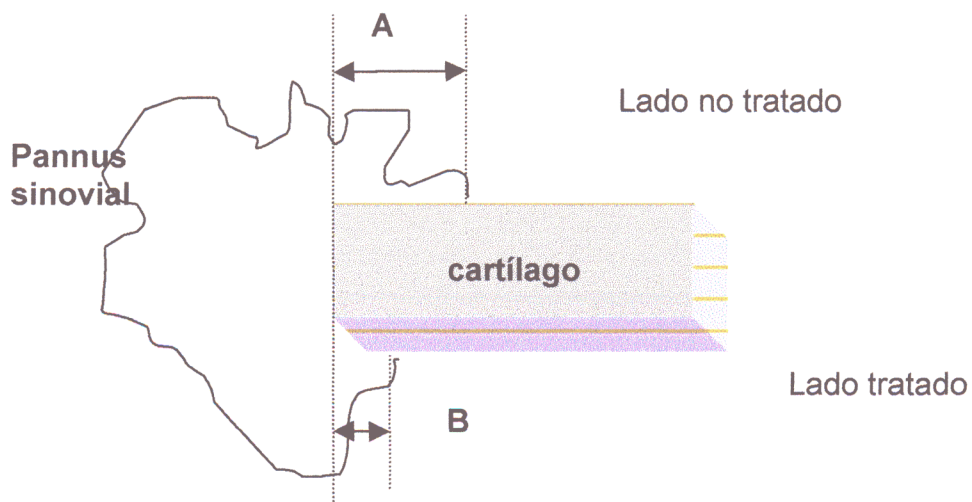


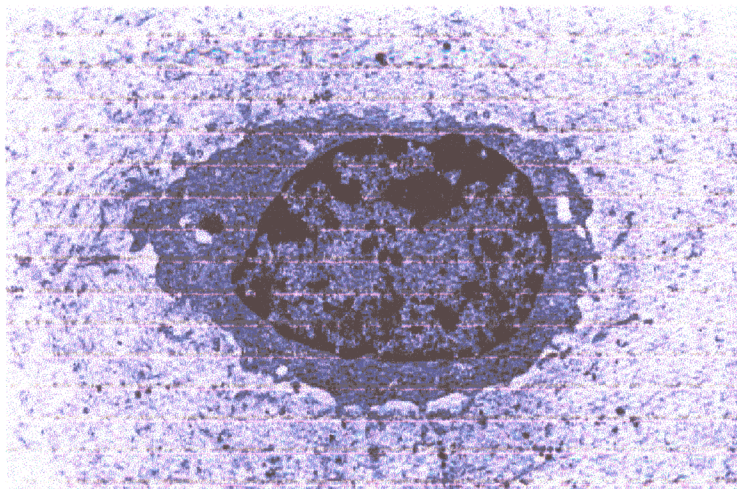
TABLA.2.

COMPONENTES PROTEICOS NO COLAGENOS		
CUANTITATIVAMENTE MAYORES		
Proteoglicanos	3 x 10 ⁶	Dotan de resistencia (densidad de carga fija)
agregantes o agreanos	210.000 core	
Proteína de unión	38.600	Estabiliza los agreanos
CUANTITATIVAMENTE MENORES (< 5%)		
NO ESPECIFICOS		
Biglicano	38.000 core 76.300	desconocida Homólogo a la fibromodulina y decorina
Decorina	36.500 core 74.600	Modula fibrillogénesis Evita la mineralización? Homólogo a biglicano.
Fibromodulina (59 kDa)	41.000	Modula la formación de fibrillas de colágeno Evita la mineralización?
58 kDa	58.000	Estimula el anclaje cel. Interacciona con colágeno ?
Fibronectina	550.000	Estimula el anclaje celular Interacciona con colágeno y glicosaminoglicanos
ESPECIFICOS		
CMP (148 kDa)	148.000	Interacciona con glicosaminoglicanos. Fibrillogénesis ?.
COMP	100.000 x n	Desconocida
36 kDa	36.000	Anclaje celular
Ancorina	34.000	Se une a cól. II Une colágeno-condrocitos
Condrocalcina		Func. desconocida en el sano Se une a hidroxiapatita
Ch21	21.000	Producido por condrocitos hipertróficos. ?

CONDROCITOS

Son células de origen mesenquimal que se encuentran rodeadas por la matriz de forma aislada o en pequeños grupos isogénicos. Los condrocitos son los responsables de la síntesis del cartílago articular durante el desarrollo, del mantenimiento del cartílago adulto normal y también de su destrucción en los procesos degenerativos (MANKIN Y COLS, 1994). Los condrocitos son los encargados de orquestar el balance entre la síntesis de los componentes de la matriz, la incorporación de estos componentes a la matriz ya establecida y la destrucción de la misma como parte del proceso de mantenimiento normal del tejido. Los condrocitos responden a una variedad de factores, como factores de crecimiento y citoquinas (pequeñas proteínas que influyen en una multitud de funciones celulares, incluyendo la migración, proliferación, diferenciación y síntesis de matriz -HELMINEN Y COLS, 1987, POOLE, 1994-). Los condrocitos son capaces de recibir, de muy diversas formas, señales desde su entorno y traducirlas en productos bioquímicos, que mantienen el cartílago normal desde el punto de vista biomecánico.

FIG.9. Microscopía electrónica de un condrocito. 3000x.



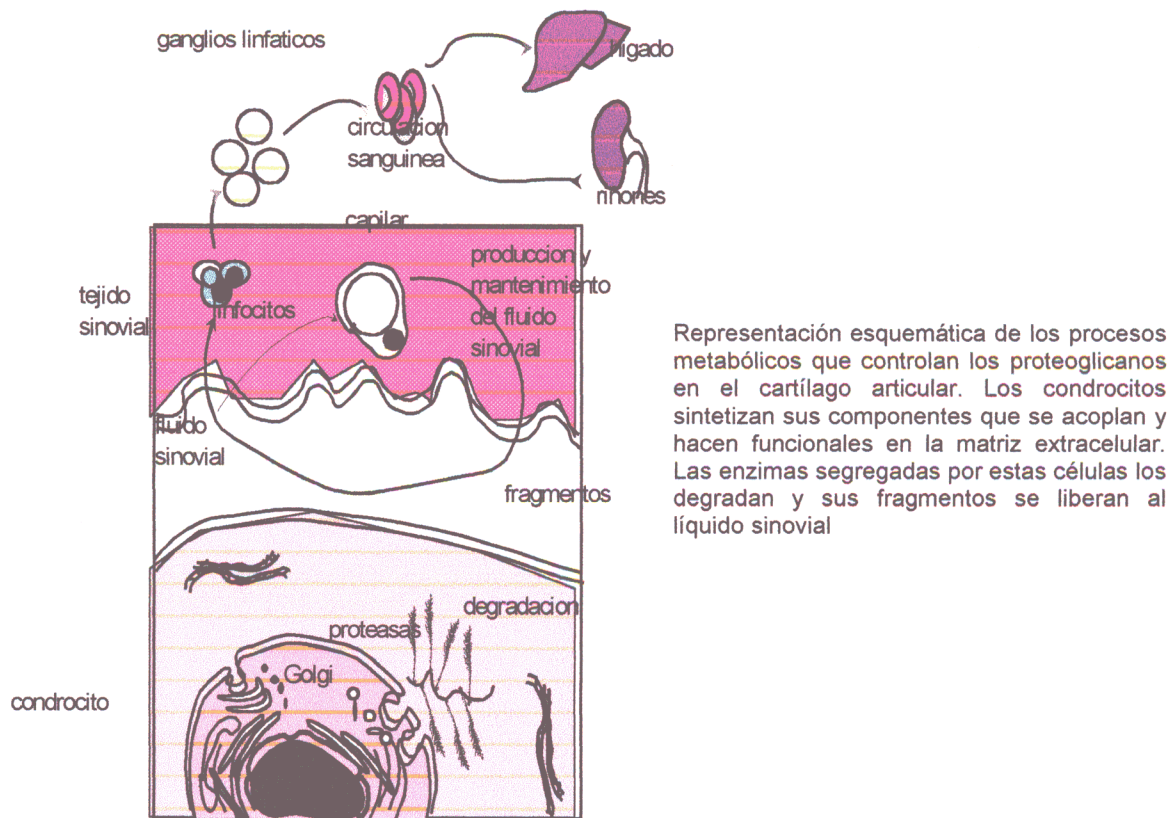
Los condrocitos representan tan sólo el 5-10 % del volumen tisular (HAMERMAN Y SCHUBERT; 1972). Esto representa una celularidad media de 15.000 células por milímetro cúbico, escasa con respecto a otros tejidos de nuestra economía (MAROUDAS Y COL; 1975). La densidad celular no varía con la edad. Se encuentra una relación entre el espesor y la densidad celular del cartílago: a mayor espesor del mismo, mayor densidad celular. Sin embargo, según STOCKWELL (1971), la densidad celular con relación a la unidad de superficie se mantendría constante. El número de células varía igualmente según la profundidad, como hemos visto, siendo la capa superficial la más celular. Estas células superficiales son elipsoidales y dispuestas en paralelo a la superficie. Constan de menos citoplasma y organelas lo que sugiere una menor actividad metabólica. Según WEISS Y COL. (1968) representan una población celular quiescente. Por el contrario, los condrocitos profundos tienen una forma esférica con gran cantidad de organelas responsables de una actividad de síntesis más intensa (STOCKWELL Y MEACHIM; 1979).

ACTIVIDAD METABOLICA

Se ha calculado que el ritmo de sustitución de los glicosaminoglicanos es aproximadamente de un 50% al año, mientras que el colágeno sólo alcanza esta tasa a los 10 años (MAROUDAS; 1975). En el cartílago están presentes todas las enzimas necesarias para su degradación, excepto la hialuronidasa, producida por la membrana sinovial. Además de las enzimas endógenas, las proteínas colagenolíticas de los polimorfonucleares, proteinasas, hialuronidasas y proteasas de los lisosomas de los sinoviocitos, y las

catabolinas de monocitos y macrófagos contribuyen a la destrucción tisular, hallándose aumentadas en situaciones patológicas (POOLE Y COLS, 1994).

FIG.10.



Destaca en este tejido un escaso consumo de oxígeno, que es con relación a otros tejidos hasta 50 ó 100 veces menor, predominando por tanto los procesos de glucolisis y metabolismo anaerobio (BYWATERS, 1937).

La nutrición de este tejido avascular tiene lugar a partir del líquido sinovial, a través de poros de la matriz fundamental, de un tamaño de 2.5 a 6.5 nm. El transporte de agua y pequeños solutos (únicos capaces de atravesar este filtro) se realiza por difusión o convección (deformación de áreas variables en el curso de los movimientos articulares -MAROUDAS, 1979-). En el adulto,

TRUEETA Y HARRISON en 1959 demostraron la existencia de capilares transversales en la placa ósea subcondral para atender los requerimientos nutricionales de la capa de cartílago calcificado.

En el cartílago articular adulto se acepta clásicamente la ausencia de mitosis. Aunque éstas no se observan con microscopía óptica, esto no significa que el cartílago no renueve sus componentes celulares, si bien la división celular es un fenómeno infrecuente (MANKIN, 1963).

SUPERFICIE ARTICULAR

Es importante conocer su morfología normal puesto que muchas de las lesiones comienzan en la superficie para progresar hacia el interior. El aspecto liso que ofrece macroscópicamente o con microscopía óptica se demuestra como lleno de ondulaciones y crestas con la microscopía electrónica de barrido. Estas ondulaciones parecen jugar un papel importante en la lubricación y nutrición del cartílago al atrapar el líquido sinovial entre las superficies de fricción (REDLER Y ZIMNY; 1970).

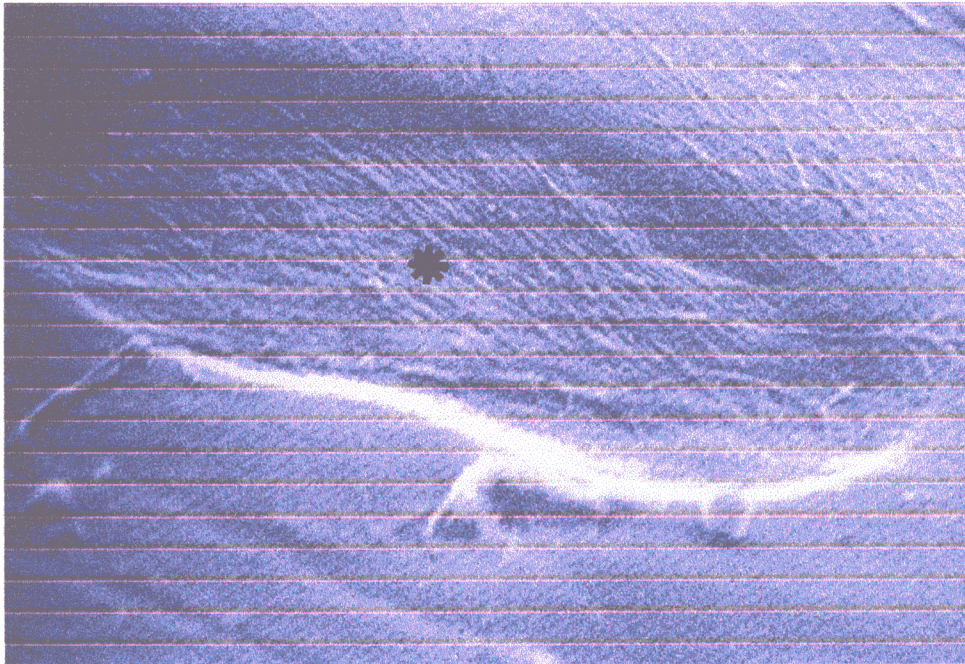
GARDNER Y COL. (1975) agrupan las ondulaciones de la superficie cartilaginosa en cuatro tipos, dependiendo del tamaño de dichas irregularidades:

1. Primarias : corresponden al contorno general de la articulación;
2. Secundarias : de hasta 1 mm de tamaño, se relacionan con las asperezas del hueso subcondral;
3. Terciarias : de diámetro mucho menor, 20-40 micras, parecen en realidad, corresponder a artefactos, aunque en un principio se relacionaron con las improntas producidas por los condrocitos.

4. Cuaternarias : 1-2 micras de diámetro. Se encuentran en líneas paralelas en la misma dirección a los movimientos de la articulación. Corresponden a la reflexión de los haces de colágeno.

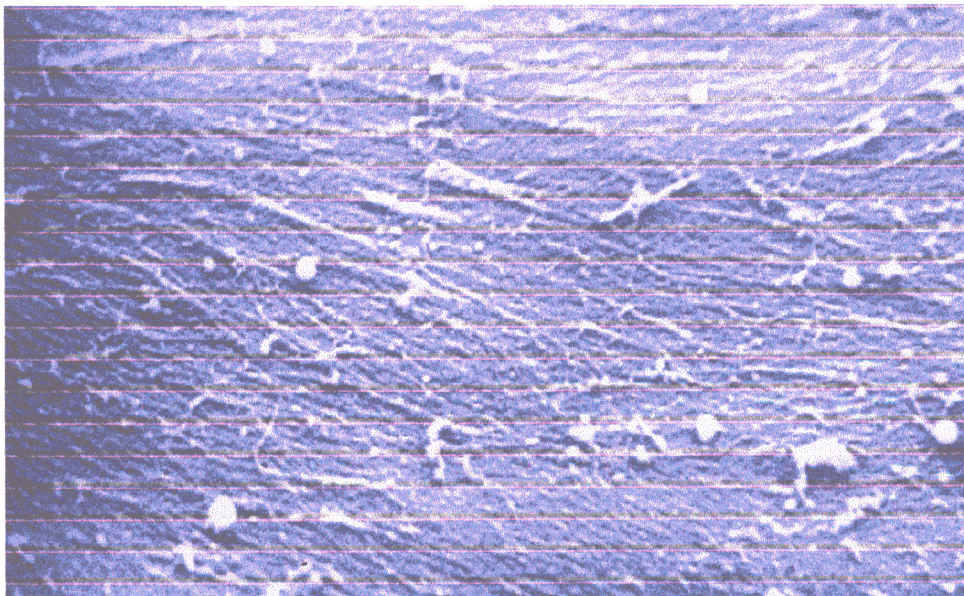
FIG. 11.

Microscopía electrónica de barrido mostrando depresión superficial correspondiente a una irregularidad 3ª



1500x.

Trama fibrilar superficial. Irregularidad cuaternaria. 1500x



FUNCIONES BIOMECÁNICAS DEL CARTILAGO ARTICULAR

La función del cartílago articular fue ya descrita de forma muy descriptiva por HUNTER en 1743:

“Los cartílagos articulares son los que contribuyen de una forma más decisiva a la función de movimiento de dichas partes. Mediante su superficie uniforme, se mueven con facilidad una contra otra; por su blanda, suave y resbalosa superficie se previene la abrasión mutua; por su flexibilidad, las superficies contiguas están constantemente adaptadas la una a la otra, y la fricción se difunde por igual en el todo; por su elasticidad, la violencia de cualquier golpe, que puede ocurrir al correr, saltar, etc., se rompe y gasta de forma gradual, pudiendo haber sido extremadamente perniciosa, si las superficies duras de los huesos hubieran estado inmediatamente contiguas”.

Dos son las funciones fundamentales del cartílago: la transmisión de cargas y la facilitación de los movimientos. A estos requerimientos responden dos propiedades intrínsecas del cartílago, la resistencia a la compresión y a la tensión.

- **RESISTENCIA A LA COMPRESION**

La resistencia mecánica del cartílago a los esfuerzos de compresión ha sido estudiada por SOKOLOFF (1966) y KEMPSON (1970). El cartílago se puede asemejar a un cuerpo viscoelástico como el caucho, con un módulo de elasticidad de Young variable según la articulación y su espesor. Se calcula en unos 840 N/cm² para la cadera y de 1530 N/cm² para la rodilla (KEMPSON, 1975).

La firmeza del cartílago parece depender del contenido en glicosaminoglicanos, existiendo una relación lineal entre éste y el módulo de elasticidad (CAMERON Y COL. ; 1975).

Los glicosaminoglicanos pueden resistir a la compresión mediante varios mecanismos:

1. Repulsión electrostática entre las moléculas, cargadas negativamente;
2. Rigidez intrínseca de los agregados de glicosaminoglicanos;
3. Resistencia friccional del flujo de fluidos a través de los poros del espacio intramolecular.

Su comportamiento ante una fuerza de compresión constante se describe como una “curva de indentación” en función del tiempo, con relación a dos efectos: una respuesta elástica de la fase sólida y una respuesta de la fase fluida que se traduce por una deformación. Cuando las fuerzas de compresión cesan, el cartílago presenta una curva de recuperación bifásica, con una recuperación rápida al principio que se enlentece gradualmente en el tiempo. La primera representa la recuperación elástica y la segunda la reimpibición del agua perdida.

• RESISTENCIA A LA TENSION

Una tensión aplicada de forma paralela a la superficie ejerce una resistencia en el cartílago que disminuye significativamente desde ésta hacia la profundidad y es mayor en el eje preferencial de las fibras de colágeno (KEMPSON Y COL. , 1973).

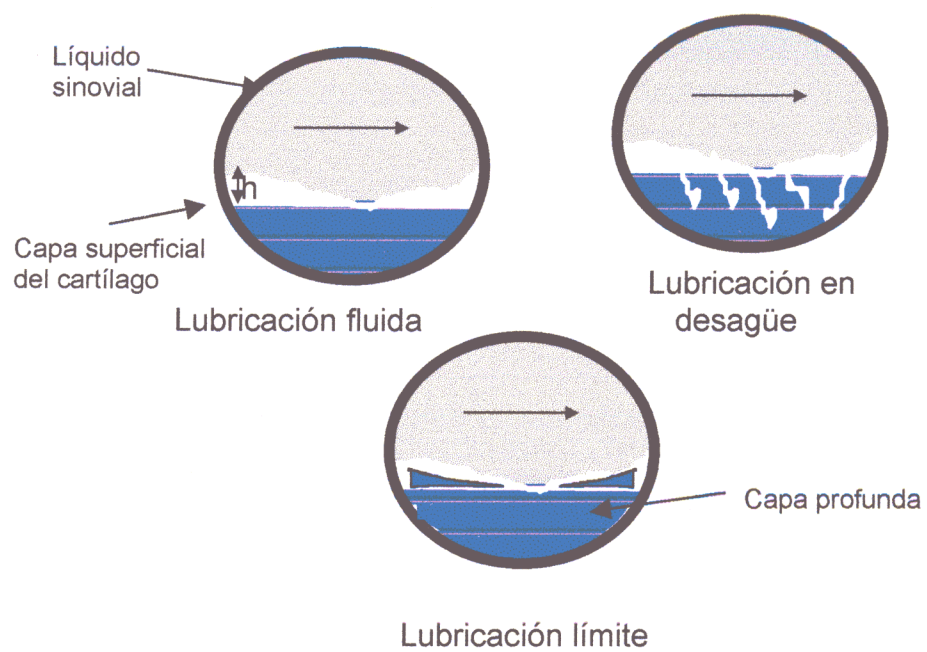
LUBRICACION

Esta propiedad es fundamental para la facilitación de los movimientos articulares. Según estudios industriales, el coeficiente de fricción de las articulaciones sinoviales es muy bajo. En la correcta lubricación articular intervienen tanto el líquido sinovial como las superficies cartilaginosas. Así, se pueden distinguir:

1. Lubricación fluida: se produce cuando una película de fluido separa completamente una superficie de otra. La resistencia al movimiento en este caso depende de la viscosidad del fluido. En el caso del líquido sinovial, se trata de un fluido "no newtoniano", es decir, su viscosidad disminuye al aumentar la viveza de los movimientos. Bajo una carga, la superficie cartilaginosa se deforma, creando una depresión que es menos estrecha en su periferia que en su centro, atrapando el fluido y dejando la lubricación a su cargo.
2. Lubricación límite: está creada por una fina capa de moléculas adheridas a la superficie que evita el contacto entre las superficies irregulares. Las fuerzas friccionales en este caso son proporcionales a la carga e independientes de la superficie de contacto y la velocidad de desplazamiento. Este tipo de lubricación actúa de forma óptima en condiciones de baja carga.
3. Lubricación por desagüe: es una forma de lubricación hidrostática que corresponde a la lubricación debida al paso de fluido a través de los poros del cartílago cuando está sometido a compresión. Este tipo actúa sobre todo ante fuerzas de compresión intensas.

FIG. 12.

Tipos de lubricación en el cartílago articular.



LESION DEL CARTILAGO ARTICULAR

LESIONES MECANICAS DEL CARTILAGO ARTICULAR

Las lesiones mecánicas del cartílago articular ocurren cuando la articulación se somete a un sobreesfuerzo repetitivo y prolongado, un impacto súbito produce una fuerza de compresión intensa a través del tejido, o una fuerza de cizallamiento a nivel de la unión con el hueso subcondral (FINERMAN Y NOYES; 1992). Estas fuerzas provocan lesiones que pueden ser diferenciadas en tres tipos:

1. Microlesión celular y lesión a la matriz sin que se produzca una interrupción visible en la superficie articular;
2. Disrupción macroscópica o laceración del cartílago articular (fractura condral),
3. Fractura del cartílago articular y del hueso subcondral (fractura osteocondral).

LESION CARTILAGINOSA SIN DISRUPCION TISULAR

La lesión está provocada por un único impacto de intensidad moderada o varios microtraumatismos repetidos. Este tipo de lesión es identificable por un descenso en la concentración de proteoglicanos de la matriz, un aumento en la hidratación tisular y posiblemente, una alteración de la organización fibrilar del colágeno. Además, el traumatismo puede lesionar los condrocitos o alterar sus actividades sintéticas y degradativas (POOLE, 1994). La naturaleza exacta de este tipo de lesión no ha sido bien estudiada aunque las alteraciones citadas pueden corresponder sólo a una primera fase de lesión.

Un impacto más severo puede producir anomalías y muerte entre la población celular así como el debilitamiento de la malla colágena. Estas lesiones pueden ir acompañadas de daño a la unión ósea y pueden provocar un remodelado reactivo del hueso subcondral con aumento de la replicación a nivel de la lámina eosinófila (BULLOUGH Y JAGANNATH; 1983). La pérdida de proteoglicanos y el aumento del contenido acuoso están correlacionados de forma directa con una disminución de la rigidez del cartilago y un aumento de su permeabilidad hidráulica. Estos cambios en las propiedades del tejido provocan un descenso en la presurización de fluido en el intersticio y alteran la capacidad de transporte a través de éste (FINERMAN Y NOYES; 1992). Dichos efectos provocan, a su vez, un aumento en la sobrecarga de la matriz de colágeno y proteoglicanos y pueden aumentar la vulnerabilidad de la matriz extracelular ante nuevas lesiones.

Además de estas lesiones cartilaginosas debidas al traumatismo, frecuentemente se asocia la rotura de la membrana sinovial, lo que deja a la superficie cartilaginosa expuesta a los factores inflamatorios de la sinovial, los cuales pueden añadir una lesión enzimática del cartilago.

Al contrario, cuando las articulaciones sinoviales se inmovilizan o se encuentran en estado de desuso, en el cartilago tiene lugar un activo proceso de remodelación (HELMINEN Y COLS. , 1987). Estos cambios funcionales pueden resultar en una pérdida dramática de los proteoglicanos del cartilago. Sin embargo, al reutilizar la articulación, los condrocitos aparentemente dormidos despiertan y comienzan a sintetizar nueva matriz, siendo posible recuperar la antigua forma y función. Esto indica que los condrocitos tienen el potencial de reparar el cartilago, al menos en ciertos tipos de lesión. Sin

embargo, este tipo de reparación puede llevar semanas o meses hasta la normalidad. Se cree que los condrocitos son capaces de detectar cambios en la composición matricial que desencadenan su respuesta reparadora (PALMOSKI Y COLS. , 1979). El mecanismo de trasducción de la señal que es detectado por las células y la forma en que los condrocitos la traducen en alteraciones metabólicas son todavía desconocidas.

Después de lesiones intraarticulares, como una lesión meniscal o ruptura del ligamento cruzado anterior, la capacidad de los condrocitos para la reparación es insuficiente la mayoría de las veces para mantener un cartilago funcionalmente normal. Esto ocurre cuando las células son incapaces de reparar las microlesiones de la matriz extracelular de forma suficientemente rápida. Se desconoce el punto a partir del cual la lesión se hace irreversible. Presumiblemente, los condrocitos pueden restablecer la matriz perdida siempre que la pérdida no sobrepase la tasa de producción. Si además hay daño concomitante a la malla de colágeno o si un número suficiente de condrocitos ha sido destruido, se establece un proceso de degeneración irreversible.

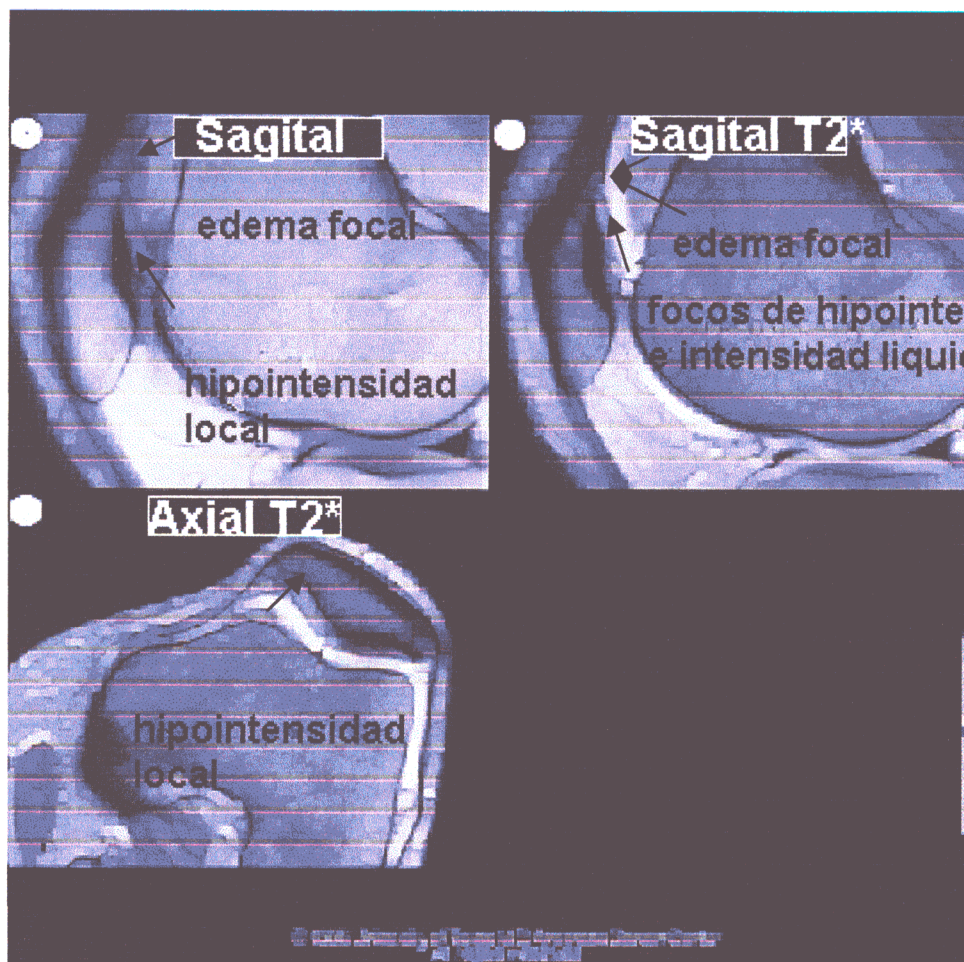
FRACTURAS CONDRALES

De forma general, se admite que aquellas lesiones del cartilago que no sobrepasan la lámina limitante eosinófila no se reparan (CAMPBELL, 1969). Una compresión actuando sobre una superficie articular producirá toda una variedad de fuerzas (tensión, compresión, cizallamiento y presión hidrostática) dentro del cartilago. Estas fuerzas, cuando son suficientemente intensas, pueden provocar fisuras condrales, colgajos y fracturas, así como lesión de los condrocitos, que pueden necrosarse y formar células fantasma. La pérdida de

segmentos significativos de la superficie articular pueden producir derrame articular, dolor y síntomas mecánicos como crepitación y bloqueos, y puede proseguir hacia la degeneración de la articulación (BUCKWALTER Y MOW, 1992). Debido a que el cartílago carece de vascularización, estas lesiones no provocan hemorragia, formación de coágulos de fibrina ni provocan respuesta inflamatoria. Los condrocitos responden proliferando y aumentando la síntesis de macromoléculas de la matriz cerca del lugar lesionado (MANKIN, 1982), es lo que FREEMAN Y MEACHIM (1979) denominaron reparación intrínseca. Desafortunadamente, la matriz sintetizada de nuevo y las células proliferantes no rellenan el defecto tisular cuando éste es grande, y por tanto, no se restablece la superficie articular. Además, si estos defectos son de gran tamaño, se produce una sobrecarga del cartílago adyacente y del hueso subcondral bajo el mismo, que puede conducir a la degeneración del cartílago previamente sano, y, con el tiempo, afectarse toda la articulación. CONVERY Y COLS. (1972) establecieron en 3 mm el límite reparativo del cartílago en lesiones profundas provocadas en caballos. Cuando la lesión excedía los 9 mm, la artrosis era inevitable.

FIG.13

Lesiones de espesor incompleto en condromalacia rotuliana, evidenciadas por cambios de señal en RMN.



LESIONES OSTEOCONDRALES

Las lesiones articulares agudas de un impacto severo pueden producir fracturas que se extienden al hueso subcondral. Al contrario que las fracturas condrales, estas lesiones provocan hemorragia y formación de coágulos de fibrina, y por tanto, activan la respuesta inflamatoria y con ella la reparación extrínseca (MEACHIM Y OSBORNE, 1970). Estos acontecimientos alteran el

líquido sinovial y el ambiente articular. Poco después de la lesión, la sangre que escapa de los vasos sanguíneos en el hueso dañado forma un hematoma, que temporalmente rellena el defecto creado. El coágulo de fibrina se extiende desde el hueso hasta una distancia variable en el espesor del cartílago. Las plaquetas atrapadas por el coágulo liberan mediadores vasoactivos y factores de crecimiento o citoquinas. Estos factores incluyen el factor de crecimiento y transformación beta (TGF- β) y el factor de crecimiento plaquetario.

La matriz ósea contiene asimismo numerosos factores de crecimiento, como el TGF- β , BMP, factor de crecimiento plaquetario y otros factores de crecimiento semejantes a la insulina. La liberación de estos factores puede jugar un papel importante en la estimulación de la reparación de los defectos osteocondrales. En particular, estos factores estimulan la invasión vascular y la migración de células indiferenciadas, así como su proliferación y diferenciación en células semejantes a los condrocitos en la porción condral del defecto. Algunas de estas células mesenquimales indiferenciadas que migran al defecto se vuelven redondeadas como condrocitos y empiezan a sintetizar matriz que contiene colágeno de tipo II y concentraciones relativamente elevadas de proteoglicanos. Estas células producen zonas semejantes al cartílago hialino en las regiones condral y ósea del defecto. Las células de la zona condral sintetizan además abundante colágeno de tipo I, mientras que las de la parte ósea sintetizan hueso inmaduro que es reemplazado de forma gradual por hueso maduro.

La composición del tejido de reparación cartilaginoso no reproduce la estructura del cartílago normal (MANKIN Y COLS. , 1994). Sus fibras colágenas están orientadas al azar, y poseen un módulo de elasticidad menor que el tejido

normal y una mayor permeabilidad. Este tejido puede permanecer invariable o por el contrario, remodelarse progresivamente hasta formar una superficie articular más funcional con el tiempo (BUCKWALTER Y MOW, 1992). Sin embargo, en la mayoría de los casos, el tejido de reparación condral y los defectos osteocondrales grandes empiezan a mostrar evidencias de pérdida de proteoglicanos de la matriz, fragmentación, fibrilación y pérdida de las células semejantes a los condrocitos. Las células restantes adoptan típicamente la morfología de fibroblastos al tiempo que la matriz que las rodea queda compuesta fundamentalmente por densos paquetes de fibras de colágeno tipo I. Es característico que existan "hendiduras" entre el nuevo cartílago y el cartílago normal adyacente que sugieren la falta de una interdigitación firme entre el cartílago antiguo y el de reparación. Este tejido fibroso generalmente se fragmenta y desintegra en un período de un año, y puede dejar grandes áreas de hueso subcondral expuesto.

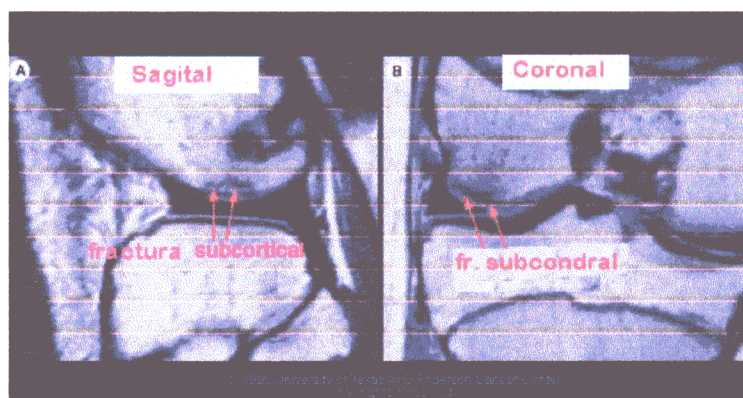


FIG.14.

Fractura subcondral. Imágenes RMN potenciadas en T2.

• **REPARACION DE LESIONES ARTICULARES: CAPACIDAD INTRINSECA, AUTOINJERTOS Y ALOINJERTOS OSTEOCONDRALES.**

Ya en 1853, SIR JAMES PAGET hace la siguiente afirmación:

".....no hay casos en los que una porción de cartílago perdida haya sido restaurada o una porción lesionada cicatrizada con un cartílago nuevo, bien formado y permanente en el sujeto humano."

Este punto de vista fue más tarde corroborado por CAMPBELL (1969) que examinó multitud de defectos cartilaginosos en varias especies animales no encontrando tejido normal en ninguna de ellas. GHADIALLY (1983), experimentando con animales, estableció:

"....Heridas superficiales o defectos de espesor parcial que no violan el hueso subcondral no cicatrizan nunca o de forma excepcional, mientras si pueden hacerlo las lesiones profundas o de espesor completo que penetran hasta el hueso subcondral mediante un tejido de reparación que surge de los espacios medulares (y) ...ni la forma ni el lugar del defecto, la madurez o inmadurez esquelética de individuo afecta de forma significativa el resultado final de dichas lesiones."

Considerando los métodos de restaurar una superficie articular lesionada o degenerada, es importante distinguir dos conceptos:

1. **Reparación del cartílago articular**, que hace referencia a la cicatrización de los tejidos lesionados o sustitución de los tejidos perdidos mediante la proliferación celular y la síntesis de nueva matriz extracelular. Desdichadamente, como hemos visto, el cartílago articular reparado no reproduce la estructura, composición o funciones del tejido normal.
2. **Regeneración del cartilago articular**, representa la formación de una enteramente nueva superficie articular, que duplica el cartílago original.

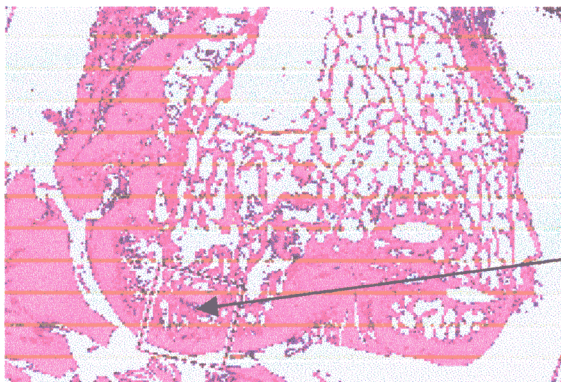
Las células de cuerpo humano se han clasificado en tres grupos según su capacidad de regeneración: lábiles, estables y permanentes. Las células lábiles siguen proliferando durante toda la vida del sujeto. Las células estables conservan esta capacidad, aunque en estado normal no se duplican. Las células permanentes no pueden reproducirse después del nacimiento (LEBLOND Y WALKER, 1956). Las células que constituyen el cartílago articular se consideran células estables. Este grupo, en estado normal, muestra un nivel bajo pero claro de duplicación. Sin embargo, las células pueden experimentar divisiones rápidas como reacción a diversos estímulos y son capaces de reconstituir el tejido de origen. La mayor parte de las lesiones corporales experimentan reparación por regeneración de células parenquimatosas, acompañada de mayor o menor cicatrización de tejido conectivo. La calidad y suficiencia de estos procesos en el tejido está determinada por la capacidad de regeneración de las células afectadas, la extensión de la lesión y la actividad proliferativa del estroma de tejido conectivo que llena los defectos restantes después de cesar la regeneración parenquimatosa.

FIG.15.

LEFKOE (1995) establece experimentalmente en 3 mm de diámetro y 2 mm de desplazamiento de la superficie articular las dimensiones del defecto articular necesarias para provocar cambios degenerativos a largo plazo. Lesiones articulares menores curan con "restitutio ad integrum", como muestran las imágenes macro y microscópica. (CORR, 1995)



Lesión
de 2mm



Histología del
defecto, relleno
completo

Además de esta distinción, no hay que olvidar que el fin fundamental de la reparación de lesiones articulares es restaurar la movilidad articular y conseguir un arco de movilidad completo e indoloro. Los resultados de las series clínicas que comparan unos métodos con otros presentan el inconveniente fundamental de no distinguir entre el grado de lesión inicial en muchos casos, lo que lleva a valorar resultados equiparando lesiones extensas y profundas con otras mucho más leves, y lesiones de origen traumático con lesiones degenerativas. La diferencia fundamental entre las lesiones de origen traumático y las degenerativas es que el daño provocado por un traumatismo suele dar lugar a defectos articulares aislados que con frecuencia dejan el resto de la superficie articular intacta. Además, suelen acontecer en pacientes más jóvenes con mayor demanda funcional. Si estas lesiones son graves y no se tratan, pueden conducir a la degeneración articular, como ya hemos visto.

Las lesiones de origen traumático más leves presentan el problema, al igual que los estadios iniciales de la artrosis, de la falta de desarrollo de métodos para detectar la lesión articular en ausencia de interrupción de la superficie, pero la identificación del descenso de la rigidez y resistencia tisular durante la cirugía representa un modo de aproximarse al diagnóstico. La gammagrafía ósea y la RMI pueden detectar alteraciones en el hueso subcondral siguiendo a la lesión articular, pero la relación entre estos hallazgos y el daño cartilaginoso no se ha establecido con precisión. El uso de marcadores bioquímicos para analizar el líquido sinovial, suero y orina ofrece un medio potencial para determinar el metabolismo del cartílago y su degeneración (POOLE, 1994), pero estas pruebas no están todavía disponibles en la clínica de manera rutinaria. Si esto lograra hacerse de forma rutinaria, se podrían

detectar las fases más tempranas de la lesión cartilaginosa, se instauraría un tratamiento precoz y su efectividad podría ser seguida con estos marcadores.

Los tratamientos actuales de las fracturas condrales incluyen el desbridamiento de los bordes de la fractura y la extracción de los fragmentos libres de la articulación. Cuando la pérdida de cartílago es importante, algunos cirujanos aconsejan la abrasión o la perforación del hueso subcondral adyacente. Los estudios sobre el relleno de los defectos con fragmentos de cartílago o con aloinjertos condrales u osteocondrales serán comentados más adelante.

Las grandes fracturas osteocondrales en las que el cartílago permanece intacto junto con el hueso pueden ser tratadas mediante la reducción abierta precoz y la fijación interna. Si la fractura no se trata de forma temprana, los fragmentos se remodelan, lo que provoca una reducción completa más difícil. La evidencia disponible indica que la superficie articular también cicatriza y se remodela en el lugar donde ocurrió la fractura osteocondral, especialmente en el esqueleto inmaduro. Las fracturas osteocondrales más pequeñas y aquellas en las que el cartílago no está en condiciones de ser restituido se tratan actualmente con desbridamiento. Los aloinjertos osteocondrales han sido utilizados con éxito en determinadas fracturas osteocondrales en las que la región lesionada forma parte de la zona de carga de la articulación. El potencial de reparación de las lesiones cartilaginosas aumenta con la movilización pasiva continua de la articulación para autores como SALTER Y COL. (1979).

Las articulaciones con problemas degenerativos del cartílago articular representan un problema mucho más complejo que los defectos focales en articulaciones por lo demás, normales. No está claro todavía si el estimular la

formación de una nueva superficie articular en las regiones con artrosis localizada producirá beneficios clínicos a largo plazo.

MÉTODOS DE ESTIMULAR LA REPARACIÓN DE UNA SUPERFICIE ARTICULAR

El éxito de un método determinado para restaurar una superficie articular dañada o degenerada se ha estudiado con frecuencia comparando el tejido de reparación que rellena el defecto condral, tanto en su composición como propiedades mecánicas con el cartílago articular normal. Sin embargo, el relleno de un defecto con tejido de reparación no siempre se acompaña en la clínica de una disminución o desaparición del dolor o de una movilidad articular mejor, que deberían ser los criterios fundamentales para medir el éxito de una u otra técnica.

Hay numerosos estudios experimentales y clínicos que prueban la existencia de métodos que estimulan la formación de tejidos de reparación. Algunos de ellos incluyen la alteración de la transmisión de las cargas en la articulación, la introducción de nuevas células formadoras de cartílago mediante su penetración desde el hueso subcondral y las denominadas artroplastias biológicas. Dada la capacidad limitada de los condrocitos maduros para reparar los defectos cartilaginosos, uno de los acercamientos potencialmente más productivos parece ser la introducción de una nueva población celular en un defecto condral u osteocondral. Estas células pueden ser obtenidas de poblaciones crecidas en cultivo en combinación con matrices artificiales y factores condrogénicos que estimulen la formación de cartílago nuevo.

- **ALTERACION DE LAS CARGAS APLICADAS A UNA ARTICULACION**

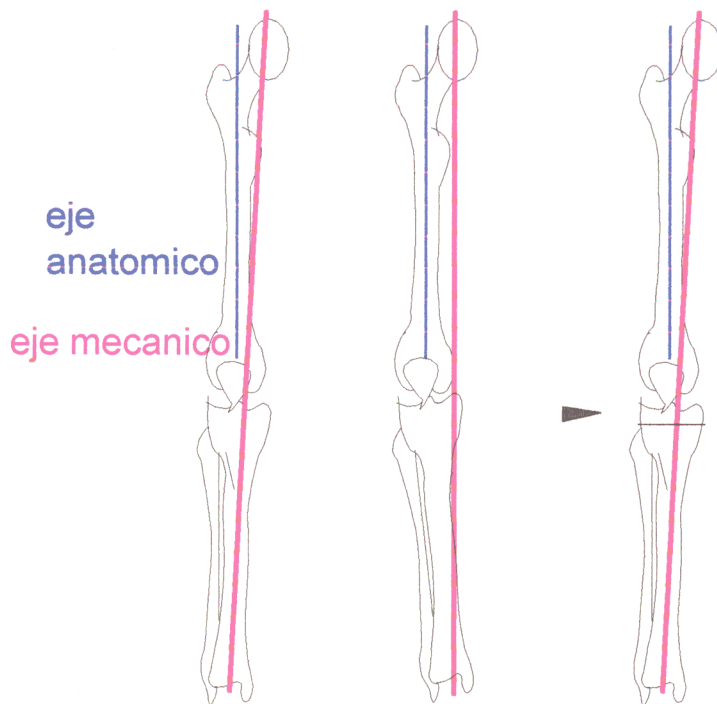
Las cargas y el movimiento de una articulación pueden tener un impacto considerable en la progresión de la degeneración articular y en la reparación del cartílago (RADIN Y COLS., 1990). Las sobrecargas en una articulación dañada pueden acelerar la degeneración y destruir el tejido reparado. La inmovilización prolongada y descarga de una articulación contribuirán también a la degeneración articular y acelerarán el proceso degenerativo al recibir cargas de nuevo. Sin embargo, reducir el nivel de sobrecarga del cartílago degenerado puede estimular la reparación, y la carga y movilidad controladas, incluyendo la movilización pasiva, pueden facilitar la reparación y mantenimiento de la movilidad articular (SALTER Y COLS., 1980).

Clínicamente se usan dos métodos para alterar la transmisión de fuerzas a través de una articulación: las osteotomías y liberaciones musculares. Sin embargo, los resultados clínicos son impredecibles a pesar de la evidencia experimental de la reparación cartilaginosa, ya que la relación entre la alteración de cargas y formación de cartílago no está bien definida. El mayor beneficio de esta cirugía se obtiene con una indicación correcta. Los pacientes obesos o con afectación multicameral, en el caso de la rodilla, deben ser tratados con otro método, ya que sus resultados son sistemáticamente desalentadores.

Las liberaciones musculares, en mayor uso hace algún tiempo, se reservan hoy para algunos casos de afectación del cartílago de la articulación femoro-patelar, en los que se realizan liberaciones de los alerones rotulianos si la etiología responde a un desequilibrio entre éstos.

FIG. 16.

Ejes de la rodilla y corrección de su alteración mediante osteotomía de tibia.



- **LAVADO ARTICULAR**

Una de las técnicas más básicas y tradicionales es el lavado. El lavado artroscópico, preconizado por JACKSON (1991), obtiene resultados temporales e incompletos. Está basado en el alivio sintomático producido por la eliminación de los productos de deshecho articulares y mediadores de la inflamación generados en las articulaciones lesionadas.

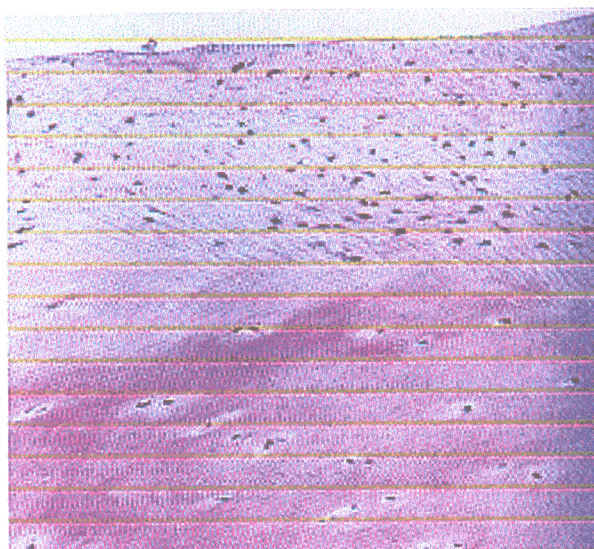
- **PERFORACION, ABRASION O FRACTURA DEL HUESO SUBCONDRA**

La penetración quirúrgica del hueso subcondral para interrumpir los vasos sanguíneos intraóseos conduce la formación de un coágulo de fibrina, libera factores de crecimiento de la matriz e introduce nuevas células en el

defecto cartilaginoso (RADIN Y COLS. , 1990). Estas células proliferan y sintetizarán una matriz cartilaginosa de reparación. La calidad y volumen del tejido de reparación varían considerablemente dependiendo de la localización y tamaño del defecto y probablemente también del método usado para la penetración del hueso subcondral, y puede ser influida por las cargas aplicadas durante el proceso de rehabilitación tras la intervención. Debido a estos factores, los resultados clínicos de esta técnica son variables y difíciles de predecir. Algunos pacientes mejoran ostensiblemente y el tejido de reparación persiste durante años, mientras otros no encuentran alivio sintomático.

FIG. 17.

Imágenes que muestran tejido de reparación 3 años después de artroplastia de abrasión.



- **ESTIMULACION DE LA FORMACION DEL COAGULO DE FIBRINA**

En los tejidos vascularizados, la formación de coágulos de fibrina (incluyendo la liberación de factores de crecimiento por parte de las plaquetas) tiene un papel importante en la iniciación del proceso de reparación. Las citoquinas liberadas por el coágulo producen un estímulo quimiotáctico y mitogénico para las células mesenquimales que migrarán hacia el coágulo que actúa como una matriz temporal para estas células. Potencialmente, un coágulo podría tener un efecto similar en los tejidos no vascularizados como el cartílago (BUCKWALTER Y COLS. , 1992).

Dado que los proteoglicanos de la matriz extracelular pueden inhibir la formación del coágulo en los defectos condrales, los investigadores han propuesto la irrigación de los defectos con soluciones salinas o enzimáticas que degraden los proteoglicanos de forma que permitan a la fibrina formar un coágulo adherido al defecto que provocaría la migración celular que rellena el defecto con material celular (SPEER, 1979). Sin embargo, NEVO Y COLS. (1987) en su trabajo experimental con BRIV (biological resorbable immobilization vehicle, vehículo de inmovilización biológica reabsorbible, derivado de fibrinógeno y trombina) no encuentran reparación en los defectos rellenos sólo con este compuesto.

Esta técnica se puede utilizar también como adyuvante en los procesos de regeneración cartilaginosa, al igual que los que vienen a continuación.

- **FACTORES ESTIMULADORES DE LA CONDRÓGENESIS**

Una multitud de factores de crecimiento polipeptídicos (como TGF- β ; BMP, FGF o insuline-likeGF) influyen en los condrocitos y en otras funciones de células mesenquimales, como la migración celular, proliferación, síntesis de matriz, o diferenciación. Los efectos de estos factores pueden también modificar directamente la matriz extracelular y por tanto, modular las señales transmitidas a las células desde la matriz que las rodea (por ejemplo, fuerzas, presión osmótica, flujo, etc.).

Trabajos experimentales muestran que determinados factores de crecimiento pueden estimular la formación de tejido cartilaginoso in vivo e in vitro (HUNZINGER Y ROSENBERG, 1994). Todos los factores de crecimiento han demostrado tener una actividad mitogénica para los condrocitos in vitro; y el FGF, TGF- β y el insulín-likeGF han demostrado estimular la producción de matriz in vivo. Además, algunos factores de crecimiento potencian los efectos metabólicos de otros factores. Por ejemplo, el TGF- β puede potencial la actividad mitogénica del FGF o del il-GF, que a su vez actúan de forma sinérgica para estimular la síntesis de matriz.

- **IMPLANTACION DE MATRICES SINTETICAS**

Rellenar los defectos cartilaginosos con matrices sintéticas puede proveer de una malla de soporte que promueva la migración celular y otorgue a estas células de un soporte hasta que éstas sintetizen nueva matriz. Este soporte orgánico permite el relleno de defectos de mayor tamaño. Estas matrices pueden ser fabricadas con fibras de colágeno, fibras de carbono (FREED Y COLS. , 1991, HEMMEN Y COLS, 1991, VACANTI Y COLS. , 1991,

VON SCHROEDER Y COLS. , 1991) , geles de glicosaminoglicanos (ITALY Y COLS. , 1987, WAKITANI Y COLS. , 1989), para rellenar específicamente los defectos en las superficies articulares y regenerando un contorno articular normal. In vitro, el crecimiento celular depende de la densidad celular inicial, del grosor de la malla tridimensional y de las condiciones de cultivo (FREED Y COLS. , 1994). In vivo, se observa una condrogénesis asociada debida al aporte de células del huésped que migran hacia el defecto, que se objetiva en animales de experimentación (FREED Y COLS. , 1993).

VERBRUGGEN (1996) propone esta técnica como método de reparar defectos articulares profundos, que alcanzan el hueso subcondral, pues sostiene que el tejido de reparación puede conservarse como cartílago hialino (como en sus primeras etapas) sin transformarse en fibrocartílago gracias a la presencia de estas mallas que permiten a los neocondrocitos la síntesis de una nueva matriz extracelular. Otro acercamiento probable puede ser el utilizar estas matrices como medios tridimensionales de sustento de condrocitos o células mesenquimales que pueden ser sembradas en su interior.

• CAMPOS ELECTROMAGNETICOS

Las células mesenquimales responden a los campos electromagnéticos mediante la alteración de sus actividades sintéticas y proliferativas. Los estudios in vitro han demostrado que los campos estimulan la proliferación condrocítica y la síntesis de proteoglicanos. Limitados estudios in vivo sugieren que el tratamiento de los defectos osteocondrales con campos electromagnéticos pulsátiles estimula el volumen y calidad del tejido de reparación (BUCKWALTER Y MOW, 1992).

METODOS DE REGENERACION DEL CARTILAGO ARTICULAR**• TRATAMIENTO CON ALOINJERTOS:**

La sustitución del cartílago articular lesionado por aloinjertos presenta las ventajas sobre los autoinjertos propias de estos materiales: cantidad de injerto suficiente, morbilidad del sitio donante inexistente, y posibilidad de modelar el injerto según la localización y forma del defecto. Se pueden distinguir varios tipos de aloinjerto con respecto a su estructura macroscópica: aloinjertos osteocondrales en cáscara y aloinjertos osteocondrales masivos o hemiarticulaciones (CZITROM Y GROSS, 1992).

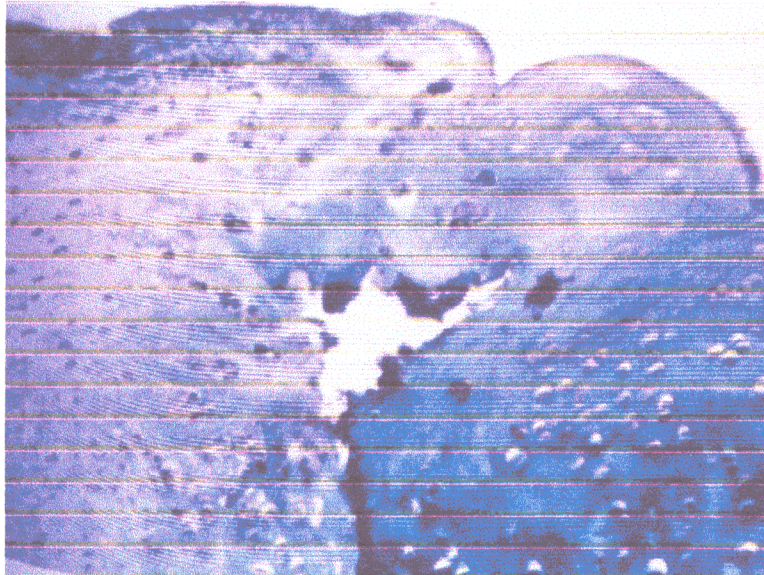
Los aloinjertos osteocondrales “en cáscara” consisten en cartílago articular con una fina lámina de hueso subyacente. Pueden utilizarse en fresco, en cuyo caso presentan problemas de coordinación entre el donante y receptor y de posible transmisión de enfermedades, además de la respuesta inmunológica del receptor. Tanto el hueso como el cartílago son fuentes potenciales de inmunogenicidad (FRIEDLANDER, 1983). Estos aloinjertos se han utilizado clínicamente con éxito variable según las series (GROSS Y COLS. , 1975; LOCHT Y COLS. , 1984; MEYERS Y CHATTERJEE, 1978; OUTERBRIDGE, 1971). Debido a su privilegiado medio de nutrición, los condrocitos pueden sobrevivir el trasplante mediante la difusión de nutrientes desde el líquido sinovial. Se requieren condrocitos viables después del procedimiento para mantener la matriz, sobre todo su componente de proteoglicanos. El hueso subcondral, sin embargo, es resorbido y reemplazado por hueso del receptor (LANE Y COLS. , 1977). Es en este proceso de invasión

vascular y reemplazamiento por hueso nuevo en el que el huésped es sensibilizado a los antígenos celulares del injerto. Experimentalmente, el cartílago de los aloinjertos en cáscara sufre fibrilación, fragmentación y erosión. Se puede encontrar incluso un pannus inflamatorio y se han identificado anticuerpos contra antígenos del donante y contra antígenos de la matriz cartilaginosa (CAMPBELL Y COLS. , 1963; RODRIGO Y COLS. , 1978; YABLON Y COLS. , 1977). Los mediadores de la inflamación parecen también jugar un papel en la destrucción inmune del cartílago, por colagenasas y proteasas producidas por macrófagos, monocitos y otras células. Estos mediadores parecen estimular a los fibroblastos de la membrana sinovial y a los condrocitos del cartílago que a su vez producen enzimas que degradan activamente su propia matriz (KRANE Y AMENTO, 1983).

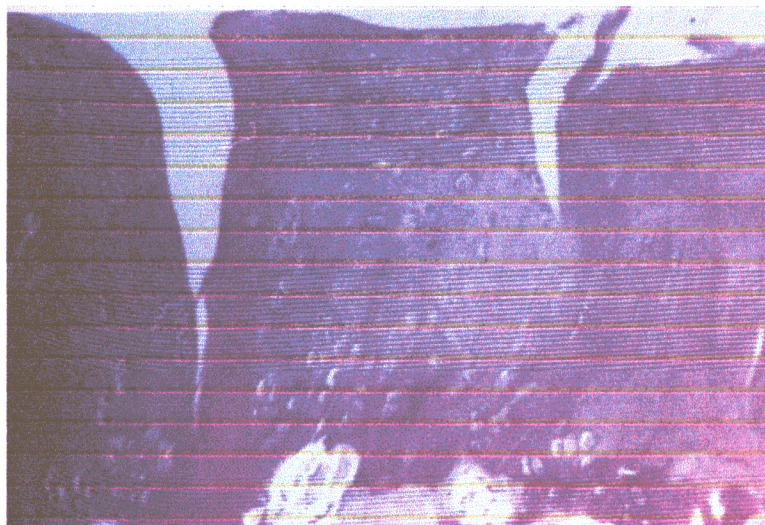
Sin embargo, el principal problema de los aloinjertos osteocondrales en cáscara está representado por la unión injerto-huésped, en la que se pueden encontrar tres tipos de comportamiento fundamentales, según refiere MARCO (1990):

1. Aposición entre tejidos con intentos de continuidad entre los mismos, con frecuencia objetivándose una zona hipertrófica procedente del huésped que, a modo de espolón, se superpone al implante;
2. Persistencia de una hendidura única o múltiples fisuras entre ambos tejidos o;
3. Relleno de esta hendidura con tejido cicatricial fibroso.

FIG. 18. Tejido fibroso que rellena hendidura injerto-huésped, formando un espolón de tejido de receptor que intenta abarcar el injerto. Imágenes cedidas por MARCO(1990).



Unión aloinjerto crioconservado con glicerol-huésped, con interposición de tejido hipercelular diferenciado y con hendidura injerto-huésped. PAS, 125x.



Los aloinjertos osteocondrales masivos consisten en hueso cortical, hueso esponjoso metafisario y cartílago articular con su correspondiente hueso subcondral. Estos injertos son casi siempre preservados o conservados de diferentes formas, de modo que puedan ser mantenidos vivos y trasplantados según las necesidades. Generalmente son criopreservados con un agente crioprotector como el DMSO o el glicerol, que ayuda a mantener la viabilidad de los condrocitos durante el proceso de congelación y descongelación. Estos crioprotectores no son muy efectivos en el cartílago intacto, obteniéndose con su uso unas viabilidades máximas del 40-50 % (SCHACHAR Y MCGANN, 1991; TOMFORD Y MANKIN, 1983). Tras el trasplante, el cartilago hialino ha demostrado, tanto clínica como experimentalmente, que sufre un proceso de degeneración, transformándose en fibrocartilago (CAMPBELL, 1972; AHLO, 1973; KANDEL Y COLS. , 1984). Además, estos aloinjertos masivos sensibilizan al huésped, aunque en menor grado que los injertos frescos; del 15 al 100 % de los pacientes desarrollan una respuesta humoral en forma de anticuerpos contra antígenos del tejido donante que es mensurable (LANGER Y COLS. , 1978; RODRIGO Y COLS. , 1979; FRIEDLANDER Y COLS. , 1984). Experimentalmente, se han documentado respuestas humorales tanto locales como sistémicas, así como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y citotoxicidad celular contra antígenos de superficie del injerto (STEVENSONS, 1987). En un estudio sobre aloinjertos osteocondrales masivos en perros, todos los aloinjertos, tanto los que tenían histocompatibilidad cruzada o no-cruzada y tanto frescos como congelados tuvieron resultados pobres en comparación con los autoinjertos. Sin embargo, se objetivó una respuesta diferente de forma constante. Los injertos en fresco con histocompatibilidad cruzada fueron los que

obtuvieron mayores tasas de éxito, los aloinjertos en fresco sin histocompatibilidad cruzada fueron los segundos y los de peor resultado, los aloinjertos congelados (STEVENSON Y COLS. , 1989). Algunos efectos se pueden atribuir al proceso de congelación de la pieza; mientras que otros parecen atribuibles a la respuesta del huésped al tejido histoincompatible. Todos los aloinjertos que habían sido congelados presentaban, en peso seco, una cantidad considerablemente menor de glicosaminoglicanos por miligramo, más hidroxiprolina y menor relación galactosamina-glucosamina que los injertos implantados sin criopreservación. La respuesta del huésped al tejido histoincompatible se manifestó como una pérdida de masa o sustancia cartilaginosa. Tras 11 meses in vivo, el peso en seco del cartílago de injertos incompatibles, como grupo, era significativamente menor que los injertos histocompatibles (STEVENSON Y COLS. , 1989). Los cambios degenerativos que se observaron en el cartílago articular eran similares a los de la artrosis, esto es, formación de osteofitos, pérdida de proteoglicanos, descenso en el cociente galactosamina-glucosamina, pocos cambios en el contenido de colágeno, medido éste como la concentración de hidroxiprolina y una sinovitis variable (MANKIN Y COLS. , 1970; MANKIN, 1974). La alteración de la transmisión de cargas secundaria a la inestabilidad postoperatoria resulta en una degeneración cartilaginosa, incluso en los autoinjertos (ENTIN Y COLS. , 1968; KETTLEKAMP, 1972). Sin embargo, en este modelo animal no se observaron cambios degenerativos en los autoinjertos, lo que lleva a pensar que los cambios degenerativos provienen de la respuesta del huésped a los aloinjertos más que a las fuerzas biomecánicas anormales que atraviesan la articulación. La apariencia histológica de las membranas sinoviales, con

acumulación de células plasmáticas y linfocitos, parece apoyar la inmunogenicidad de los injertos. Además, los títulos de anticuerpos en las articulaciones que habían recibido los injertos frescos histocompatibles eran cuatro o cinco veces mayores que los títulos sistémicos de los mismos perros. Otros han documentado in vivo la síntesis intraarticular de IgM e IgG (MIMS Y COLS. , 1985). Esta respuesta inflamatoria-inmune puede desencadenar la cascada que ha sido descrita para los injertos osteocondrales en cáscara.

Tras el implante, los aloinjertos osteocondrales masivos no pueden ser completamente protegidos de la carga y pueden sufrir colapso durante la incorporación, revascularización y sustitución. Además, éstos incluyen no sólo hueso cortical sino también hueso esponjoso en el área metafisaria. Esta zona presentaba un hueso con trabéculas más gruesas en los aloinjertos que en los autoinjertos (STEVENSON Y COLS. , 1991), encontrándose directamente proporcional la cantidad de tejido fibroso intertrabecular a la inmunogenicidad del injerto, mientras que la superficie formadora de hueso presentaba una relación inversa. La porción metafisaria de un aloinjerto sujeto a cargas en el postoperatorio, presenta mayor número de trabéculas necrosadas y no reparadas que contribuye al colapso subcondral y la degeneración articular detectada en la clínica (MANKIN, 1983).

No podemos dejar el capítulo de los aloinjertos osteocondrales sin recordar las precisas conclusiones del estudio experimental en conejos llevado a cabo por MARCO (1990). Este autor hace un minucioso estudio clínico e histológico de una numerosa serie de defectos osteocondrales tratados con autoinjertos inmediatos, aloinjertos inmediatos, aloinjertos refrigerados y

aloinjertos congelados con y sin crioprotección, comparándolos con defectos sin injertar y concluyendo:

1. Los defectos osteocondrales sin injerto no se rellenan nunca con cartílago hialino, objetivándose solamente fibrocartílago.
2. Las condiciones fundamentales para la buena evolución de un aloinjerto osteocondral viable son una fijación estable, una alineación correcta de la superficie y una movilización precoz de la articulación.
3. Estas condiciones se obtienen preferentemente por encaje a presión y la actividad libre del animal de experimentación.
4. Cualquier alteración del ambiente pericartilaginoso provoca en el cartílago articular alteraciones demostrables sobre todo en microscopía electrónica.
5. No han existido diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de aloinjertos y autoinjertos inmediatos.
6. Ninguno de los protocolos de conservación utilizados ha sido capaz de igualar los resultados obtenidos con los autoinjertos y aloinjertos inmediatos.
7. Los aloinjertos osteocondrales han demostrado una capacidad antigénica indiscutible. Esta antigenicidad disminuye con los procedimientos de congelación de las muestras.
8. La refrigeración y la congelación previa exposición a glicerol ha ofrecido los mejores resultados frente a las series control de auto y aloinjertos inmediatos.
9. El mejor protocolo de refrigeración resulta ser la conservación en suero salino isotónico a 4°C durante 48 horas.

10. Los agentes crioprotectores mejoran la viabilidad del cartílago postcongelación del mismo modo que en otras series. El glicerol demuestra superiores ventajas como agente crioprotector frente al DMSO. Del mismo modo, la velocidad de congelación influye en el resultado final. Debe ser lenta y controlada.

11. La temperatura de almacenamiento no afecta el resultado de la utilización posterior del cartílago, siempre que sea por debajo de -20°C .

12. La pauta de congelación de mejores resultados es el pretratamiento de la muestra con el agente crioprotector escogido al 15% durante 60 minutos, enfriamiento lento hasta la temperatura de almacenamiento y descongelación a temperatura ambiente.

Con respecto a la aplicación clínica de estos estudios, nuestro equipo presenta el estudio histológico y ultraestructural de un aloinjerto osteocondral fallido tras 20 meses de evolución (MARCO Y COLS., 1992) demostrando la conservación de la viabilidad del cartílago hialino tras este tiempo, sin mostrar alteraciones marcadas. Se objetiva una falta de paralelismo entre la evolución ósea y condral de la pieza, puesto que la porción subcondral del injerto estaba necrótica y en fase de sustitución por el lecho receptor, proceso interrumpido por la falta de incorporación completa a este nivel. En este trabajo, no se observa reacción inmune contra el injerto, sin sinovitis marcada ni pannus articular, así como una conservación del contenido de proteoglicanos de la matriz, demostrada por tinción con safranina O. Estos resultados nos hacen unirnos al grupo de autores que postulan que los factores mecánicos son más importantes que los biológicos en la supervivencia de los injertos (KANDEL Y COLS., 1977; OAKESHOTT Y COLS., 1988; RODRIGO, 1984).

A modo de resumen, podemos decir que los aloinjertos osteocondrales son todos inmunogénicos, puesto que el cartílago es vulnerable a los mediadores de la inflamación de la respuesta inmune. La criopreservación reduce la inmunogenicidad (por mecanismos no del todo conocidos) pero reduce también la tasa de viabilidad celular condrocítica. Los aloinjertos en fresco histocompatibles son los que poseen el mínimo efecto inmunogénico y se incorporan bien. Por último, simplemente nombrar la liofilización de los injertos. Este método disminuye mucho su capacidad inmunogénica pero las propiedades biomecánicas de estos injertos los hacen poco útiles en la cirugía.

• **TRATAMIENTO CON TEJIDO AUTOLOGO:**

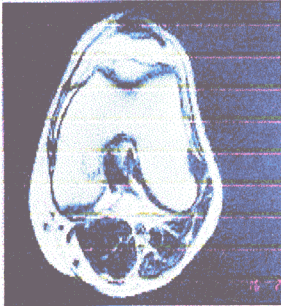
Constituyen la llamada artroplastia biológica, que reemplaza la pérdida cartilaginosa por injertos de tejidos, incluyendo fascia, músculo, tendón, periostio o pericondrio.

• **AUTOINJERTOS CONDRALES: MOSAICOPLASTIA**

Se denomina mosaicoplastia a la técnica de rellenar defectos condrales focales de espesor completo con discos de autoinjerto obtenidos de regiones alejadas de la zona de carga de esa misma articulación. STONE (1997) es pionero en esta técnica, presentando resultados preliminares en la articulación de la rodilla de 60 pacientes con defectos de diámetro medio de 213 mm. Los discos de autoinjerto son obtenidos de la zona intercondílea y pericapsular. En 11 biopsias posteriores a la cirugía, con un año de seguimiento medio, el autor encuentra cartílago hialino puro en 4 casos, una mezcla entre fibrocartílago y cartílago hialino en 5 y tejido fibrocartilaginoso en las dos restantes.

FIG.19.

A.



B.

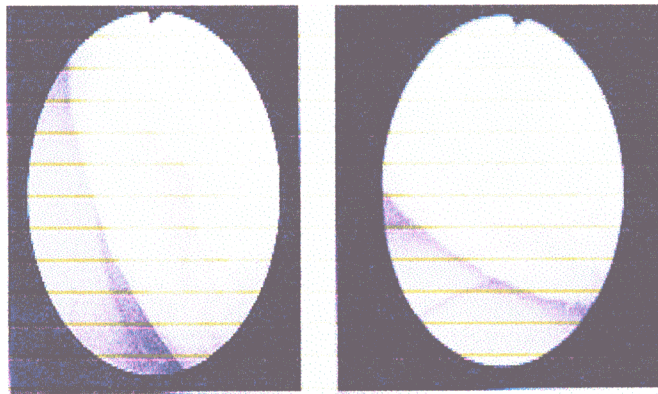


C.



A. Imagen en RMN de foco de lesión, localizado en rojo en el modelo B. Las marcas verdes representan la zona donante del injerto, cuya técnica se esquematiza en C.

D. Imagen artroscópica inicial y en la evolución a 2 años desde el tratamiento.



• INJERTOS PERIOSTALES Y PERICONDRALES

La habilidad de las células periostales y pericondrales, sobre todo las células del cambium adyacente al hueso, para formar cartílago hialino hace de ellas una fuente atractiva de células de reparación (O'DRISCOLL Y COLS. , 1988; HOMMINGA Y COLS. , 1990; MOW Y COLS. , 1991). La relativa abundancia del periostio hace de éste el tejido ideal para usarlo con frecuencia.

Estudios recientes de cirugía experimental en animales han utilizado injertos osteoperiósticos y osteopericondrales, como el obtenido de la cobertura de los cartílagos costales (RITSILÄ Y COLS. , 1994) como fuente en grandes defectos osteocondrales creados en la rótula y cóndilos femorales en la zona de carga. Los resultados indican que es posible formar un tejido que rellene el defecto y tiene la apariencia macroscópica de cartílago hialino, compartiendo también sus características histológicas. Los estudios biomecánicos y bioquímicos indican también una gran semejanza. La neocondrogénesis se ha demostrado, mediante trazadores, provenir del injerto y no del hueso subcondral (RUBAK Y COLS. , 1982). RITSILÄ Y COLS. (1994) demostraron algunos puntos importantes en la condrogénesis, determinando el ambiente como factor fundamental que determina la diferenciación de las células mesenquimales hacia la producción de hueso o de cartílago, siendo éste más importante que el fenotipo de las células trasplantadas. Parece ser que la tensión de oxígeno forma parte de este mecanismo, de modo que con una tensión de oxígeno baja se favorece el desarrollo de cartílago, mientras que si ésta es elevada, hay mayores probabilidades de obtener tejido óseo. Algún movimiento y transmisión de cargas normal a través de la articulación parecen ser importantes también en el proceso de regeneración. Los resultados clínicos de estos injertos varían considerablemente según los individuos y las articulaciones, siendo evidente que este tratamiento obtiene mejores resultados en pacientes jóvenes. Parece importante la selección previa de los candidatos a este tipo de injertos, por ejemplo, jóvenes con lesiones osteocondrales focales.

La primera experiencia clínica con los injertos pericondrales fue llevada a cabo por HOMMINGA Y COLS. (1990), en una serie de 25 pacientes

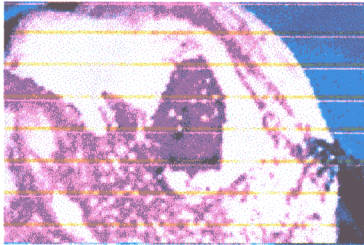
portadores de 30 lesiones condrales sintomáticas, de un grado de OUTERBRIDGE III/IV. El autoinjerto fue obtenido de los arcos costales y adherido al defecto mediante un pegamento de fibrina. Una artroscopia de control fue realizada a los 10 meses, encontrándose 27/30 defectos rellenos de tejido semejante al cartílago. Tres biopsias obtenidas al año mostraron células parecidas a los condrocitos. Dos de las muestras mostraban una disrupción entre el cartílago y la unión ósea y una de ellas exhibía continuidad.

Los inconvenientes fundamentales de esta técnica son: la morbilidad del sitio donante, la limitación del material (que a veces hace necesario el uso de varios sitios donantes en defectos grandes), la delaminación del cartílago del hueso subcondral y la posibilidad de osificación encondral del injerto.

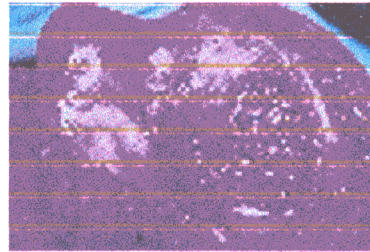
O'DRISCOLL (1996) presenta una serie de 12/20 pacientes tratados con injertos periósticos con resultados buenos o excelentes, resaltando la importancia de la selección preoperatoria de los pacientes y de una rigurosa técnica quirúrgica, puesto que pequeñas diferencias en la obtención del periostio alteran de forma dramática el número de células viables tras el procedimiento, y por tanto, la posibilidad de obtener un buen resultado.

FIG. 20.

- A. Defecto osteocondral de gran tamaño, de 3 x 4 cm.
B. Trasplante periosteal fijado con suturas en los bordes del defecto.

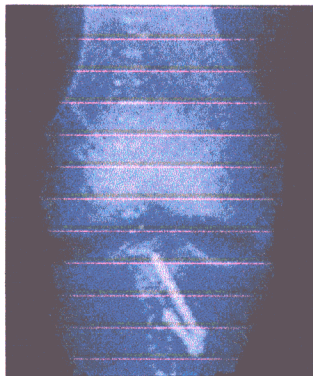


A.

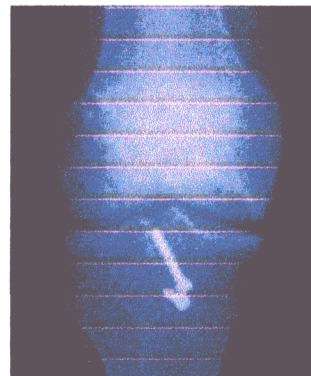


B.

- C. Rx postoperatoria que revela la extensión del defecto en el hueso subcondral.
D. Rx a los 1.5 años de seguimiento.

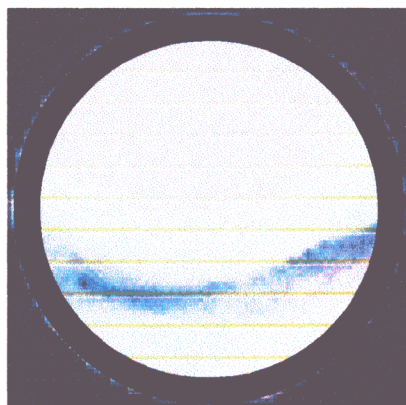


C.



D.

- E. Vista artroscópica del defecto a los 1.5 años. Se objetiva tejido de relleno con algunas áreas de fibrilación.



- **IMPLANTACION DE CONDROCITOS O CELULAS MESENQUIMALES**

Consiste en la introducción de células formadoras de cartílago en los defectos condrales. Las células trasplantadas pueden sobrevivir y sintetizar matriz extracelular que toma la apariencia de un cartílago más normal que el tejido fibroso que rellena los defectos a los que no se añaden células. Los defectos condrales de pequeño tamaño pueden ser también rellenados con células indiferenciadas, mesenquimales o pluripotenciales, expandidas en cultivo *in vivo* o *in vitro* (TAKIGAWA Y COLS. , 1987, GRANDE Y COLS. , 1989). Las células trasplantadas pueden sobrevivir y sintetizar matriz extracelular que toma la apariencia de un cartílago más normal que el tejido fibroso que rellena los defectos a los que no se añaden células. En el pasado, los resultados obtenidos con el implante de condrocitos aislados han sido poco alentadores por la falta de adherencia celular a los lugares de lesión (BENTLEY Y GRECI, 1971), o la formación de fibrocartílago o islotes de cartílago hialino rodeados de un magma fibroso (BENTLEY Y COLS. , 1978). Este problema se soluciona con la vehiculación de los condrocitos en matrices o mediante su mantenimiento dentro del defecto usando plastias pericondrales (PETERSON, 1996).

Destacan en este campo los experimentos de GRANDE Y COLS. (1982) que utilizan cultivos de condrocitos para rellenar defectos condrales en conejos, encontrando la regeneración del cartílago en el 82% de los casos trasplantados en comparación con el 18% de relleno que mostraba el grupo control, no injertado. Un método posible de aplicación a humanos implica la obtención de células mesenquimales pluripotenciales o condrocitos, expandirlos en cultivo e implantarlos en una matriz artificial, colocándolo todo después en forma de

relleno del defecto condral PETERSON Y COLS. , 1982). Este autor presenta sus resultados de nuevo en Agosto de 1996, con una serie de 7 años de seguimiento y un 80% de resultados buenos y excelentes. El autor describe su técnica, consistente en la obtención de una muestra de tejido condral del paciente sin hueso subyacente, su cultivo in vitro tras la digestión enzimática del cartílago que separa los condrocitos de la matriz, con un medio de cultivo al que añade un 10% de suero del propio paciente. La implantación se hace mediante un procedimiento abierto, en el que se rellena el defecto condral y se recubre de una capa de periostio para mantener los condrocitos trasplantados en su lugar.

Un grupo del Brigham and Women's Hospital (MINAS, SPECTOR, SHORTROFF Y COLS., en colaboración con BARONE, WRENN, GAGNE Y COLS. de la compañía Genzyme Tissue Repair de Cambridge, Massachussets, que comercializa la técnica cultivando los condrocitos extraídos del paciente) publican en 1996 un estudio comparativo sobre el relleno de defectos condrales en perros, tratándolos con injertos periósticos, injertos periósticos + células cultivadas y grupos control; encontrando mejores resultados a corto plazo (6 meses) en el grupo que añade los condrocitos autólogos, que finalmente se equipara a los tratados sólo con injerto periostal al año. Los autores atribuyen estos malos resultados al modelo más que a la técnica, afirmando que los resultados en humanos son buenos hasta la fecha.

FIG.21. Transplante de condrocitos autólogos en perros. A los seis meses, el defecto aparece relleno y se objetiva el comienzo de la producción de glicosamino -glicanos, evidente por la tinción con Safranina O. Abajo, grupo control a los seis meses.

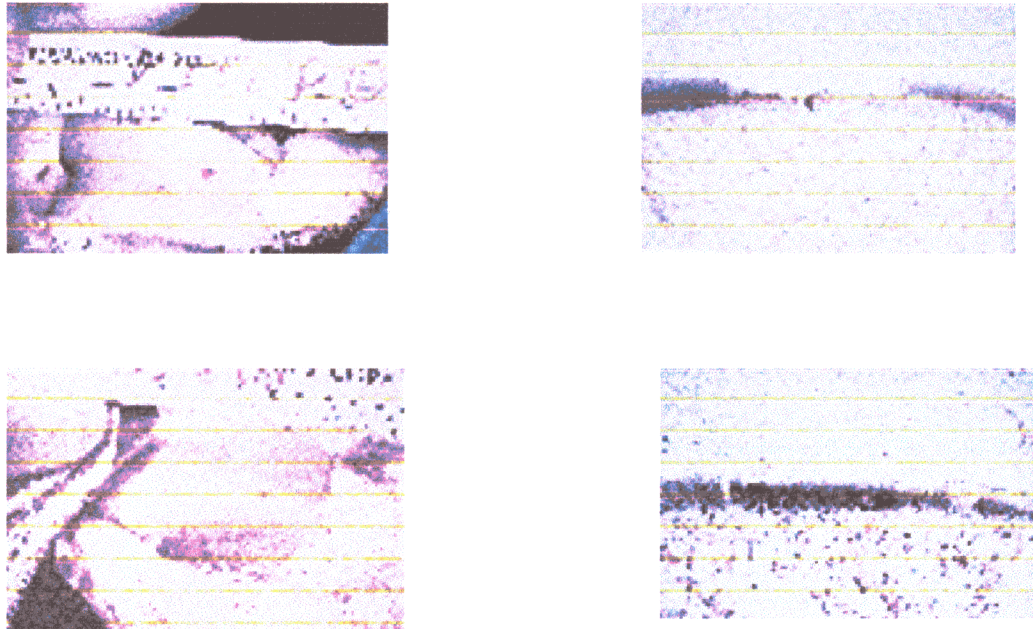


FIG.22. Esquemáticamente, técnica del implante de condrocitos autólogos expandidos in vitro.

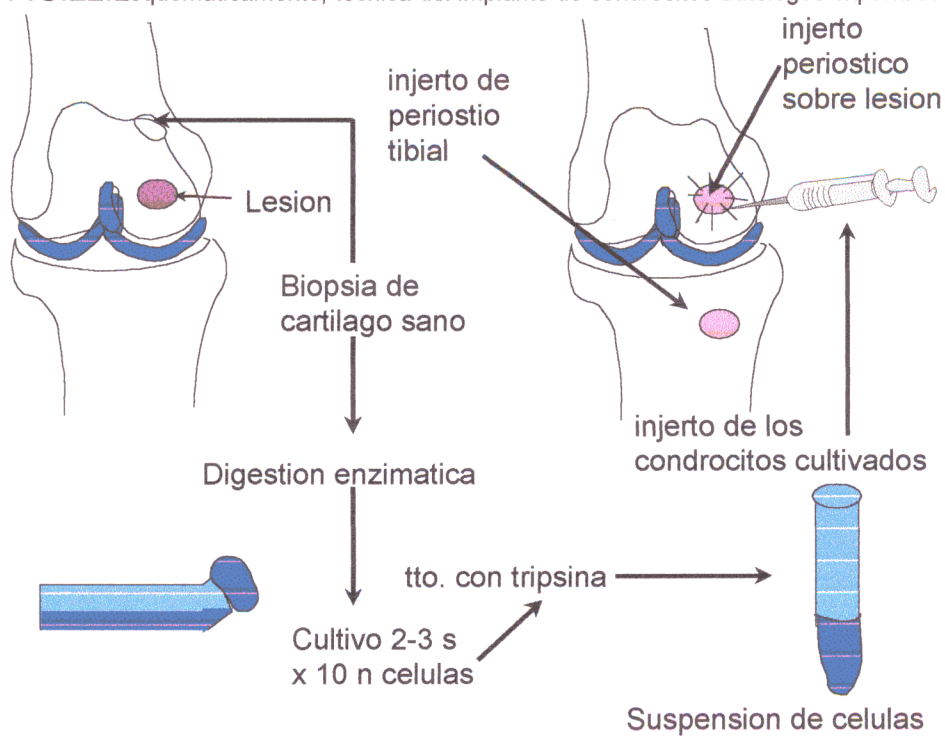


TABLA.3.

REVISION DE RESULTADOS BIBLIOGRAFICOS SOBRE EL TRATAMIENTO DE LOS DEFECTOS CONDRALES

AUTORES	Nº	RESULTADOS	COMENTARIOS
EXCISION DEL CARTÍLAGO DAÑADO Y HUESO SUBYACENTE			
FICAT Y COLS.	85	67 (79%) buenos o excelentes	Usado en el tto. de lesiones patelares
DESBRIDAMIENTO Y ABRASION			
EWING	223	163 (73%) mejoraron	A >severidad< prob de buen resultado < 40 años mejores resultados
FRIEDMAN Y COLS	73	44 (60%) mejor 25 (34%) sin cambio 4 (5%) peor	
JOHNSON SPRAGUE	>400 9	75% satisfactorios 51 (74%) buenos 11 (16%) malos 7 (10%) regulares	12% sin síntomas tras 2 a.
INJERTOS PERICONDRALES			
HOMMINGA Y COLS	25 pac. 30 def.	28 (93%) mejor funcionalidad en defectos rellenos	Biopsias mostrando tj. hialino. Resultados indep. de edad
INJERTOS OSTEOCONDRALES			
MEYERS Y COLS.	40	31 (78%) injertos cicatrizaron 13/31 (42%) excelente 14/31 (45%) bueno 4/31 (13%) regulares	No recomendado para artritis.
GROSS Y COLS.	92	69 (75%) éxito a 5 años 59 (64%) a 10 años 58 (63%) a 14 a.	Mejores resultados en < 60 años ;necesaria fijación rígida del injerto
MATRIZ DE FIBRA DE CARBONO			
MUCKLE Y COLS.	47	36 (77%) satisfactorios	No sinovitis
BRITTBERG Y COLS.	37	30/36 (83%) buenos o excelentes	Alivio sintomático no efectos 2arios.
TRASPLANTE DE CONDROCITOS AUTOLOGOS			
BRITTBERG Y COLS.	23	14/16 (88%) femorales 2/7 (29%) patelares buenos o excelentes	Eliminación de bloqueos, reducción de dolor e inflamación
PETERSON	66	47 (71%) mejor	-

• METODOS DE CONSERVACION DEL CARTILAGO

“...el problema del injerto de órganos y tejidos no se puede resolver con éxito si no se crean métodos efectivos de conservación”. B. PETRASCHER, 1913.

Conservación significa mantenimiento de la integridad, lo que supone la preservación de las cualidades biológicas de los tejidos. Desde finales del siglo XIX hasta el presente, múltiples estudios han intentado preservar condrocitos metabólicamente activos, bien en situación de aislamiento, bien incluidos en su matriz, de forma que constituyan un tejido viable capaz de ser trasplantado y mantener un cartílago articular resistente.

ANTECEDENTES HISTORICOS

El deseo de sustituir partes lesionadas o enfermas de nuestro organismo, incluyendo el aparato locomotor, ha sido constatado en multitud de documentos antiguos (BICK, 1968).

Los experimentos más antiguos sobre la conservación del cartílago se hacen sobre todo con cartílago hialino costal. Así, PRUDDEN en 1881 trasplanta cartílago hialino procedente de cabeza femoral y costal al tejido subcutáneo del conejo, exponiéndolas previamente a alcohol de 95° y objetivando la reabsorción completa de los injertos. También destacan las tempranas aportaciones prácticas de OLLIER (1867) y MACEWEN (1881). Sin embargo, las directrices contemporáneas fueron predichas e inspiradas por el trabajo de LEXTER (1908, 1925). Este autor realiza un trasplante hemiarticular completo (osteoarticular) informando de buenos resultados en el 50% de sus seguimientos.

Es CARREL en 1912 el que obtiene cartílago viable tras la implantación de cartílago costal en perros, habiéndolo almacenado previamente a 0°C durante un máximo de 28 horas.

O'CONNOR Y PIERCE en 1938 publican que el cartílago conservado en suero salino y merthiolate no mostraba signos de reabsorción cinco años después de su implante.

PEER en 1938 y 1939 contrasta la reabsorción del cartílago septal y costal humano trasplantado y conservado en alcohol en dos años con autoinjertos en fresco que presentaban apariencia normal tras seis años.

BROWN concluye en 1940 que el aloinjerto cartilaginoso conservado es inferior al trasplante en fresco.

En una larga serie, DUPERTUIS en 1941 publica la utilización de injertos cartilaginosos conservados en alcohol al 95%, merthiolate y suero salino; o bien, refrigeración durante 5 días, seguida de congelación y deshidratación. Los injertos procedían de pabellón auricular y costilla y fueron colocados heterotópicamente en tejido subcutáneo, describiendo la práctica destrucción completa de los mismos. En cambio, los auto y aloinjertos condrales en fresco de animales inmaduros crecían en los receptores.

La publicación de varias series clínicas utilizando aloinjertos osteoarticulares masivos congelados (OTTOLENGHI, 1961; PARRISH, 1966; VOLKOV, 1970) evalúa positivamente la utilización de aloinjertos en la práctica diaria. Estas series se completan con los trabajos de GROSS Y COL. (1975) sobre el trasplante de pequeñas laminillas cartilaginosas en defectos de origen artrósico, los de MANKIN Y COLS. (1976) en grandes defectos tras la cirugía

tumoral o los de MEYERS (1978), que utiliza injertos osteocondrales en fresco para el tratamiento de defectos debidos a necrosis ósea.

Muchas de estas series clínicas son todavía revisadas, destacando la serie del argentino OTTOLENGHI, que en 1982 presenta casos con 32 años de seguimiento, y que apunta a la degeneración cartilaginosa como principal causa del fallo a largo plazo de los injertos osteocondrales.

METODOS DE CONSERVACION DEL CARTILAGO

Los métodos de conservación del cartílago están determinados por el uso clínico de los mismos. En la actualidad los aloinjertos osteocondrales de utilizan en dos situaciones muy diferentes. Así, en la cirugía de reconstrucción de grandes defectos, por ejemplo la cirugía tumoral, cuando se pretende conservar la superficie articular se precisa de piezas óseas con su correspondiente recubrimiento cartilaginoso. En otros casos, se trata de defectos o lesiones limitadas, como en el caso de las osteocondritis y osteonecrosis, requiriéndose una pequeña superficie condral con una mínima capa ósea de soporte que son los llamados "injertos en cáscara", o el relleno con tejido con capacidad condrogénica que constituye la denominada "artroplastia biológica". Por ello distinguiremos las técnicas de conservación de piezas de cartílago intacto de la conservación de células aisladas en forma de cultivo.

En cualquier caso, el objetivo fundamental de todos los métodos de conservación del cartílago es la obtención de un material con un alto potencial de supervivencia y función una vez implantado. Ya desde 1960, HAGERTY Y COLS. concluyen de una serie de experimentos con ovejas, que los aloinjertos

de cartílago viable se comportaban mucho mejor que los no viables tras su implante quirúrgico. Ha habido muchos intentos de optimizar y evaluar la viabilidad de los condrocitos articulares de los injertos osteoarticulares de espesor completo antes de ser trasplantados (BERGGREN Y COLS. , 1981; BLACK Y COLS. , 1979; BRAID Y COLS. , 1966; BRIGHTON Y COLS. , 1979; LANCE, 1972; SCHACHAR Y McGANN, 1986; SCHWARTZ Y COLS. , 1981; THOMAS Y COLS. , 1984; TOMFORD, 1986; TOMFORD Y MANKIN, 1983; YABLON Y COVALL, 1978). De forma general, estos estudios sugieren que la preservación óptima del cartílago intacto requiere condiciones diferentes a las habituales para el cultivo de condrocitos aislados. Por ejemplo, GROSS Y COLS. (1975) sugieren que sólo los aloinjertos articulares condrales en fresco sobre una fina cáscara de hueso subcondral aseguran el máximo de viabilidad cartilaginosa. YABLON Y COVALL (1978), trabajando sobre la hipótesis de que el almacenamiento del cartílago es una alternativa necesaria, informaron sobre la supervivencia celular óptima de piezas de cartílago intacto conservadas a 4°C. Otros autores han sugerido el uso de técnicas de cultivo tisular con vitaminas, enzimas o inhibidores de proteasas para aumentar la viabilidad condrocítica durante el almacenamiento a 4°C (BLACK Y COLS. , 1979; BRIGHTON Y COLS. , 1979; THOMAS Y COLS. , 1984). El principal inconveniente de estas técnicas es su difícil adaptación a la conservación de grandes piezas osteocondrales. Otros autores preconizan la preservación a bajas temperaturas de los aloinjertos osteocondrales (SCHACHAR Y COLS. , 1988, 1990, 1993). Hasta la fecha sin embargo, no hay estudios sobre el tiempo que perdura la viabilidad del cartílago articular tras la muerte del donante, especialmente durante las condiciones de refrigeración usuales en el estadio

postmortem. Tampoco está claro si la viabilidad celular tras el almacenaje es afectada por las condiciones habituales de éste, como es el sumergir las muestras en medio nutriente con antibióticos.

El interés de trasplantar cartílago viable y funcionalmente intacto hace buscar marcadores que nos permitan conocer el potencial de una pieza antes de ser trasplantada. La síntesis de proteoglicanos se puede utilizar como índice específico de la actividad metabólica. Este parámetro puede ser calculado mediante la incorporación de radiosulfatos y se correlaciona de forma bastante lineal con otros marcadores de viabilidad y función articular como son el test de diacetato de fluoresceína y bromuro de etidio (FDA/EB) (CURRAN Y GIBSON, 1956).

CONSERVACION DEL CARTILAGO INTACTO

Los protocolos en uso para el almacenamiento y conservación del cartílago intacto incluyen:

1. REFRIGERACION.
2. CULTIVO DE CARTILAGO INTACTO.
3. CONGELACIÓN.
4. LIOFILIZACIÓN.

En este apartado trataremos el tema de la refrigeración de cartílago intacto, dejando las técnicas de cultivo y congelación para sus apartados correspondientes y exponiéndolas en comparación con la utilización de las mismas con condrocitos aislados.

Dentro del apartado de refrigeración se incluyen los denominados "aloinjertos en fresco", puesto que todo material donante se somete, al menos durante el tiempo necesario para la preparación del lecho receptor, a las condiciones que definen este método.

REFRIGERACION :

La refrigeración o conservación del injerto en hipotermia ($+4^{\circ}$ C, sumergiendo los fragmentos en suero salino generalmente) se plantea sólo en piezas pequeñas y con escaso soporte óseo. LOPEZ-OLIVA confirma en 1993 la utilidad de este método, limitado por el descenso de la viabilidad celular con el tiempo, sobre todo pasadas las primeras 48 horas. Este trabajo aporta la novedad de medir la viabilidad condral mediante citometría de flujo frente a métodos que la valoran sólo mediante la integridad de la membrana celular y

señala un descenso de 81.61% a 57.36% al pasar de 48 a 72 horas de refrigeración. Los resultados de esta serie son más optimistas que los publicados previamente. Así, RODRIGO Y COL. en 1980 realizan una serie conservando piezas osteocondrales a 4°C valorándolas por autorradiografía y objetivando una viabilidad similar a los controles a las 6 horas, pero con una disminución al 79% a las 24 horas y 47% a las 48 horas de refrigeración. Estos mismos autores confirman sus resultados en ratas en 1987, marcando el límite de extracción de los injertos de los posibles donantes a las 12 horas.

El inconveniente principal de la refrigeración como método de conservación es pues, su limitada durabilidad, añadiéndose un mayor riesgo de transmisión de enfermedades y una mayor respuesta inmunitaria. El relativo buen resultado clínico hace que este método siga utilizándose.

McDERMOTT y COL. (1985) analizan los aspectos clínicos de 100 pacientes intervenidos a lo largo de once años, con un seguimiento medio de 3.8 años. La mayor parte de los injertos fueron de la zona de carga de la rodilla, obteniéndose en condiciones estériles, e implantándose en menos de 24h. Durante este tiempo, permanecieron en suero salino con antibióticos. Estos autores obtienen un 75% de éxitos en los pacientes en los que la etiología del defecto articular era traumática, no siendo tan alentadores los resultados en los casos de artrosis u osteonecrosis.

Dentro del mismo grupo anterior, OAKESHOTT Y COL. (1988) publican los resultados del análisis histológico de los aloinjertos frescos fallidos. De 18 casos estudiados y a pesar de que 15 casos presentaban desaxación de la interlínea articular, con progresión degenerativa, y 14 de ellos mostraban defectos técnicos, objetivo en 12 cartílago viable a pesar de las condiciones

adversas. Para estos autores, los parámetros básicos asociados con el fallo del injerto fresco son: patología previa del receptor, alteraciones en la alineación del miembro y defectos de técnica (inestabilidad en la fijación, incongruencia anatómica o tamaño inadecuado)

CZITROM Y COLS. en 1990 determinan unas viabilidades del 66 al 99% en 3 aloinjertos osteocondrales en rodilla y codo, comprobadas por biopsia posterior a los 12, 24 y 41 meses del implante. La persistencia de condrocitos vivos fue sólo de 37% para otro caso de la misma serie con 72 meses de evolución.

En una posterior publicación de este equipo (BEAVER Y COL. 1992) se revisan las intervenciones postraumáticas obteniendo resultados buenos en el 75% de los casos a los cinco años, 64% a los diez años y 63% a los 14 años en una serie de 92 rodillas intervenidas. Por ello, recomiendan el uso de este tipo de aloinjertos en pacientes jóvenes y activos, considerando la supervivencia del injerto dependiente más de la técnica que del rechazo inmunológico.

MEYERS Y COL. publican en 1989 una serie con una tasa de éxitos del 77%, independientemente del diagnóstico. En una serie de once casos llevada a cabo en nuestro servicio, y revisada a los tres años, el porcentaje de buenos resultados se elevó al 80% (MARCO Y COL, 1993). Como prueba de la popularidad de este método, existe en el mercado un instrumental diseñado para la extracción ortotópica del donante y después implantarla en el receptor. Su diseñador (GARRETT, 1994) publica 16 éxitos de 17 casos tratados, con un seguimiento de 3.5 años.

Otro inconveniente a tener en cuenta, aparte de la biodisponibilidad de estos injertos, es su capacidad inmunogénica. El cartílago, desde LOEB (1926),

se ha considerado un tejido privilegiado desde el punto de vista inmunológico, considerándose pues, el hueso subcondral el responsable de la respuesta inmune por parte del huésped, ya que éste debe ser reabsorbido y reemplazado por hueso del lecho circundante. Es durante este proceso de invasión vascular y osteogénesis cuando el huésped se sensibiliza a los antígenos del injerto (LANE Y COL, 1977). Experimentalmente, el cartílago sobreyacente experimenta fibrilación, fragmentación y erosión produciéndose un pannus inflamatorio sinovial (ELVES, 1974; FRIEDLAENDER Y COLS. 1976; HALLORAN Y COLS. 1979).

SCHACHAR Y COLS. definen en 1994 el tiempo durante el cual permanecen los condrocitos articulares metabólicamente activos tras la muerte del donante, almacenando piezas de cartílago intacto en condiciones de refrigeración, comparándolas con las condiciones de las articulaciones in vivo, bañadas en un medio nutriente. Estos autores establecen entre 4 horas y 7 días el intervalo durante el que, de una forma razonable, pueden ser almacenados los aloinjertos a 4°C para su uso clínico. Este período es suficiente para determinar la adecuada viabilidad del injerto, su tamaño y ausencia de patología o enfermedades transmisibles. Durante este tiempo, los injertos permanecen viables y retienen parcialmente su actividad sintética, en comparación con los aloinjertos frescos. De hecho, en la mayoría de los casos, se produce una estimulación de la actividad metabólica que tiene su pico a los 3 días de almacenamiento. Este aumento puede deberse a varias razones, entre ellas, a la exposición a un medio con nutrientes, que en estudios in vitro demuestra estimular la síntesis condrocítica (TOMFORD, 1986). Otra razón puede ser el simple "hinchado" del cartílago, que aumenta la superficie por la que puede

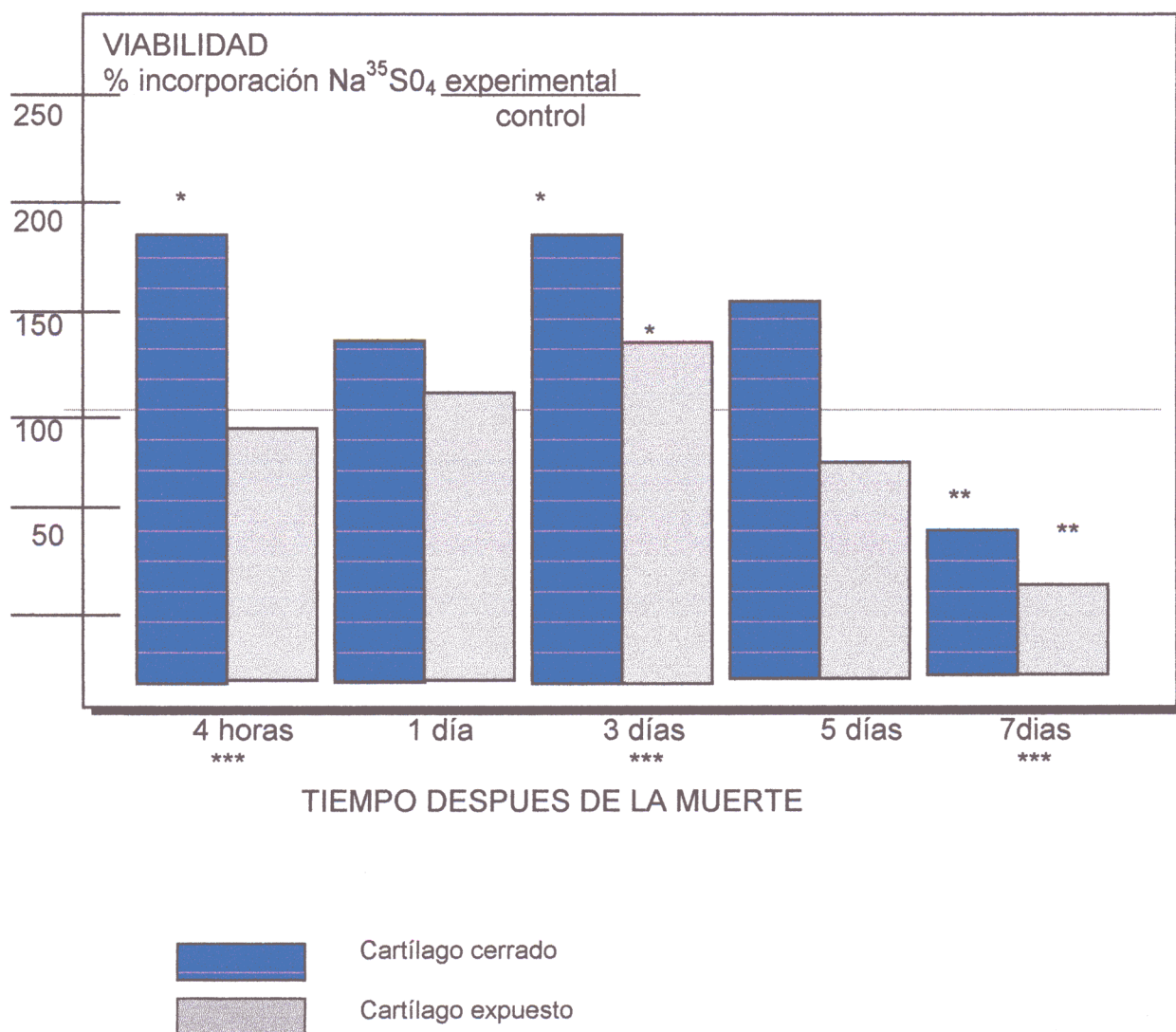
penetrar el marcador radioactivo. Otra posibilidad puede ser el estímulo de la síntesis de matriz debido a la extracción de la pieza cartilaginosa de su medio sinovial natural. Finalmente, puede ser representación o respuesta al daño tisular que supone el almacenamiento, mediante un aumento en la producción de matriz. Estos resultados están expresados en la figura siguiente, que muestra las viabilidades condrocíticas obtenidas en las dos situaciones experimentales mencionadas.

FIG. 23.

*** diferencia significativa entre expuesto y cerrado ($p < 0.003$)

** significativamente menor que el control en fresco ($p < 0.003$)

* significativamente mayor que el control en fresco ($p < 0.003$)



• CULTIVOS CELULARES

Los primeros intentos de cultivo de células de mamífero datan de principios de nuestro siglo, en una tentativa de mantener injertos tisulares in vitro (HARRISON, 1907; CARREL, 1912; ROUS Y JONES, 1916). El desarrollo consecuente de fórmulas complejas de medios de cultivo en los 50 estableció rápidamente una amplia variedad de líneas celulares (MORGAN, 1950; HEALY Y COLS. 1954) dando lugar a una herramienta de investigación de valor incalculable en los campos del desarrollo normal y la enfermedad de humanos y animales. Hoy, la disponibilidad de miles de líneas celulares animales y vegetales ofrece una fuente de material reproducible para todas las investigaciones médicas, veterinarias y del campo de la agricultura. Existen disponibles en todo el mundo colecciones de cultivos celulares, como la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC ; Salisbury ; Reino Unido).

Las células humanas cultivadas in vitro están incluidas en un ambiente artificial que se diferencia en muchos aspectos, algunos conocidos y otros no, de su hábitat normal in vivo. No existe un medio de cultivo que pueda imitar el ambiente in vivo y existen muchos y diferentes tipos de medio que experimentalmente se asocian con un mejor crecimiento de una determinada estirpe celular. Algunas células mueren inevitablemente y otras persisten a costa de perder o ganar características no observables in vivo. Ejemplos de estos cambios observados frecuentemente son la contaminación microbiana, anormalidades cromosómicas, pérdida de antígenos, pérdida de la capacidad proliferativa o muerte de la célula en cultivo.

TIPOS DE CULTIVOS

Los sistemas de cultivo se dividen básicamente dependiendo de la densidad de población celular, el tiempo de cultivo desde el aislamiento de las células y de si éstas crecen adheridas a un sustrato o en suspensión. Los cultivos de células recién aisladas se denominan cultivos primarios. Estos generalmente son heterogéneos y con una tasa de crecimiento baja, aunque suelen mantener las características celulares específicas mejor que los cultivos ya expandidos. El subcultivo o cultivo fraccionado permite un crecimiento celular más rápido y más uniforme, pero puede provocar una pérdida de la especialización debido a la dediferenciación celular o inclusión de varias líneas celulares (FRESHNEY, 1992). Cuando la densidad celular es baja y los descendientes de las células únicas forman colonias pequeñas, el procedimiento se denomina "clonal". El término "clonación" hace referencia a los experimentos en los que un nuevo cultivo se establece desde una única célula progenitora. Todos los demás experimentos que impliquen la formación de colonias desde una sola célula se llaman "crecimiento clonal". Ambos tipos de experimento se pueden realizar tanto con células en suspensión como con células incluidas en sustratos sólidos o semisólidos como el agar blando (MORRIS, 1995). Tras varios subcultivos una línea celular puede morir (línea celular finita) o transformarse en una línea celular continua, con una esperanza de vida infinita. Dado que esta transformación generalmente requiere mucho tiempo y conlleva la aparición de propiedades diferentes, así como la evidencia de que existen células inmortales per se, como la mayoría de las células neoplásicas, se cree que la senectud y muerte es la norma mientras que la inmortalización es el resultado de una o más mutaciones genéticas (PERIERA-

SMITH Y SMITH, 1988). La adquisición de la inmortalidad suele llevar asociada alteraciones en el control del crecimiento (como una disminución de la inhibición por contacto o un aumento de la tasa de crecimiento).

Los cultivos celulares densos (con muchas células incluidas en un sustrato) se denominan frecuentemente "cultivos en monocapa". El crecimiento celular en los cultivos monocapa está limitado por la superficie disponible para dicho crecimiento (inhibición por contacto). Esta superficie puede aumentarse utilizando botellas rotadoras, que giran de tal modo que toda su superficie interna está tapizada por medio de cultivo, o mediante el uso de sistemas capilares de perfusión o con suspensiones de partículas microtransportadoras a las que las células pueden adherirse y multiplicarse.

Los verdaderos cultivos en suspensión son aquellos en los que las células no están adheridas a un sustrato. Presentan la ventaja de manejar fácilmente volúmenes grandes de células y poder separarlas sin el uso de enzimas, haciendo subcultivos simplemente por dilución, así como la posibilidad de alcanzar un estado quiescente fenotípicamente estable si se precisa. Para ciertos tipos de células que no se unen unas a otras o a sustratos, es imprescindible este tipo de cultivos, como las células hematopoyéticas. Sin embargo, existen tipos celulares que precisan el contacto para crecer, como los fibroblastos o 3T3 (células embrionarias de ratón), que son incapaces de sobrevivir en medios tridimensionales.

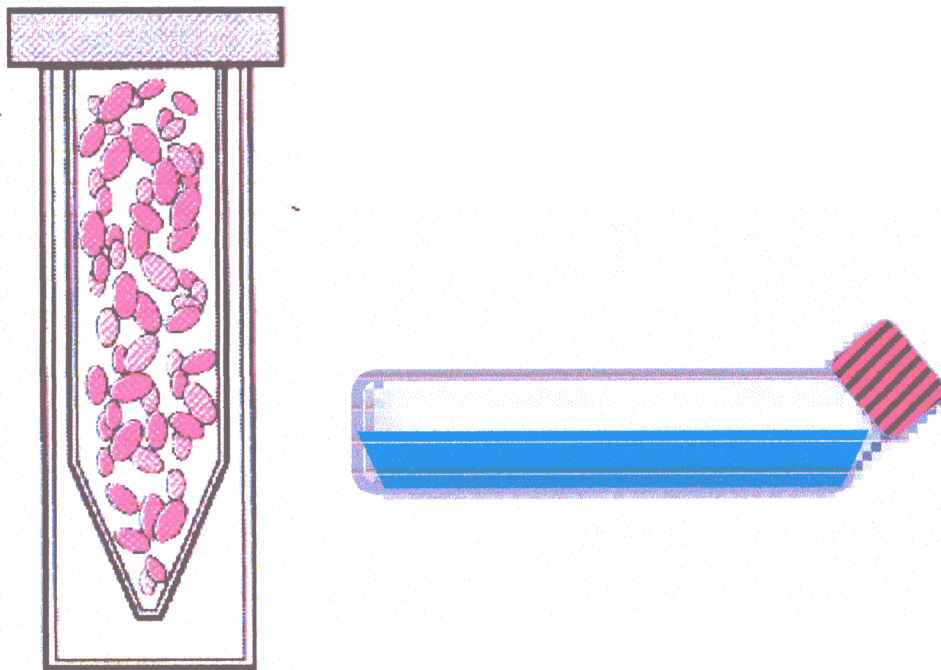


FIG.24. Recipientes para cultivos en suspensión.

También incluimos aquí los denominados cultivos de órganos o tejidos. En un principio, se denominaba cultivo tisular al cultivo de fragmentos completos de tejido con la creencia de que se mantendría, al menos en parte, la integridad histológica. Hoy en día, el cultivo tisular es un término genérico utilizado como sinónimo de cultivo de órganos, donde un pequeño fragmento de tejido o un órgano embrionario completo se explanta para mantener la arquitectura tisular, y el término cultivo celular siempre lleva implícito la dispersión mecánica o enzimática o la migración espontánea de células del tejido. El cultivo de órganos conlleva el mantenimiento de las interacciones

celulares y la diferenciación histológica y bioquímica del tejido. En general, tras la extracción, se objetiva cierta necrosis central por el traumatismo inicial, y el tejido se mantiene en un estado de no crecimiento durante bastante tiempo. Los cultivos celulares alteran la organización estructural y alteran muchas veces las propiedades bioquímicas, pero generalmente pueden expandirse en replicados idénticos, pudiendo caracterizarse la población celular, purificarse y ser criopreservada.

TABLA. 4.

Ventajas de los cultivos celulares y de órganos

Cultivo de órganos	Cultivos celulares
Histología	Expansión
Diferenciación	Clonaje, selección y purificación
Interacción celular (homo y heterotípica)	Caracterización y preservación
Interacción con la matriz	Replicación y cuantificación

CULTIVOS PRIMARIOS

Se denominan así los cultivos de células recién aisladas, crecidas in vitro y antes de ser subcultivadas. El primer paso de estos cultivos es el aislamiento, llevado a cabo mediante disección estéril de la pieza de origen celular seguida de disgregación enzimática o mecánica. El tejido puede ser simplemente troceado en fragmentos de 1 mm³ y las piezas dispuestas en bandejas donde se fijan por su adhesividad propia o usando plasma coagulado. En estos casos, las células crecerán hacia afuera del fragmento y pueden ser usadas directamente o subcultivarse. El fragmento de tejido o explante también puede ser tripsinizado y las células sembradas en un nuevo soporte constituyendo

un cultivo secundario y siendo técnicamente una línea celular, pues la disociación supone una selección celular.

ELECCION DEL MEDIO DE CULTIVO

La elección del medio para cada tipo celular es frecuentemente empírica. El medio no importa demasiado en las líneas celulares continuas, una de cuyas características es ésta, la independencia del medio. Pero las líneas celulares especializadas y los cultivos primarios suelen tener unos requerimientos específicos.

El medio debe intentar otorgar a las células unas condiciones medioambientales lo más parecidas posible a los existentes en su ambiente in vivo de origen. De entre todos los fluidos utilizados para el cultivo celular, es el suero el que tiene una más amplia aceptación. En general, cualquier tipo celular requiere de un 5-20 % de suero para un óptimo crecimiento celular.

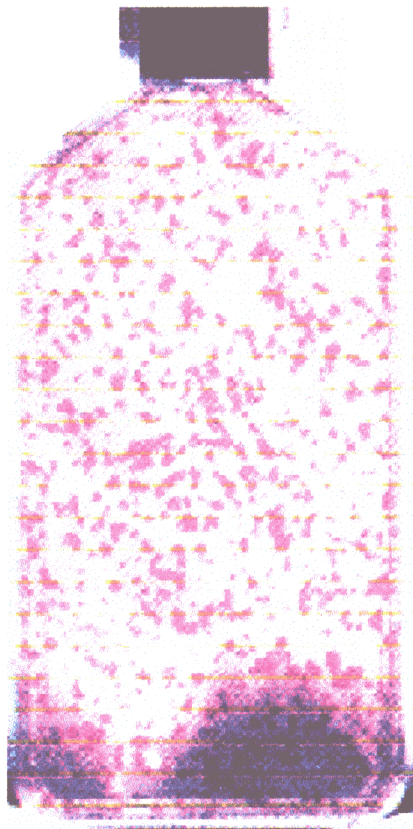
Algunas de las funciones del suero son el proveer a las células de :

1. nutrientes básicos, en solución o unidos a proteínas ;
2. hormonas y factores de crecimiento que estimulan la proliferación y las funciones específicas celulares,
3. proteínas de transporte (albúmina, transferrina, etc.), vitaminas, minerales, lípidos, etc. ;
4. factores de protección no específicos frente al daño mecánico ; viscosidad (fuerzas de cizallamiento durante la agitación de las suspensiones celulares) ;
5. inhibidores de proteasas;
6. Tamponamiento del pH (MAURER, 1995).

CULTIVO DE CONDROCITOS

Como hemos dicho repetidas veces, el cartílago es un tejido excepcional en cuanto a su avascularidad, carencia de innervación y presencia de un sólo tipo celular: el condrocito. Por ello, es relativamente fácil obtener una población homogénea de células del cartílago, no precisándose técnicas de fraccionamiento celular. Los condrocitos pueden crecer en placas de cultivo (ADOLPHE Y COLS. ; 1984) y, a diferencia de otras células diploides, se pueden mantener y crecer en suspensión (BENYA Y SCHAFFER, 1982; TAMPONNET Y COLS. ; 1991).

FIG.25.

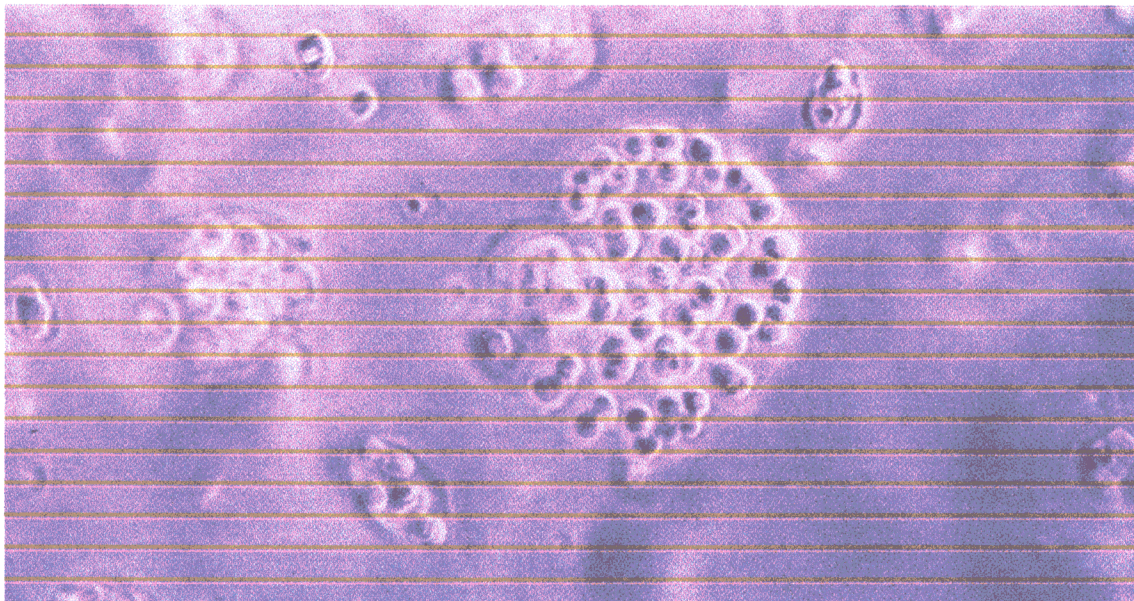


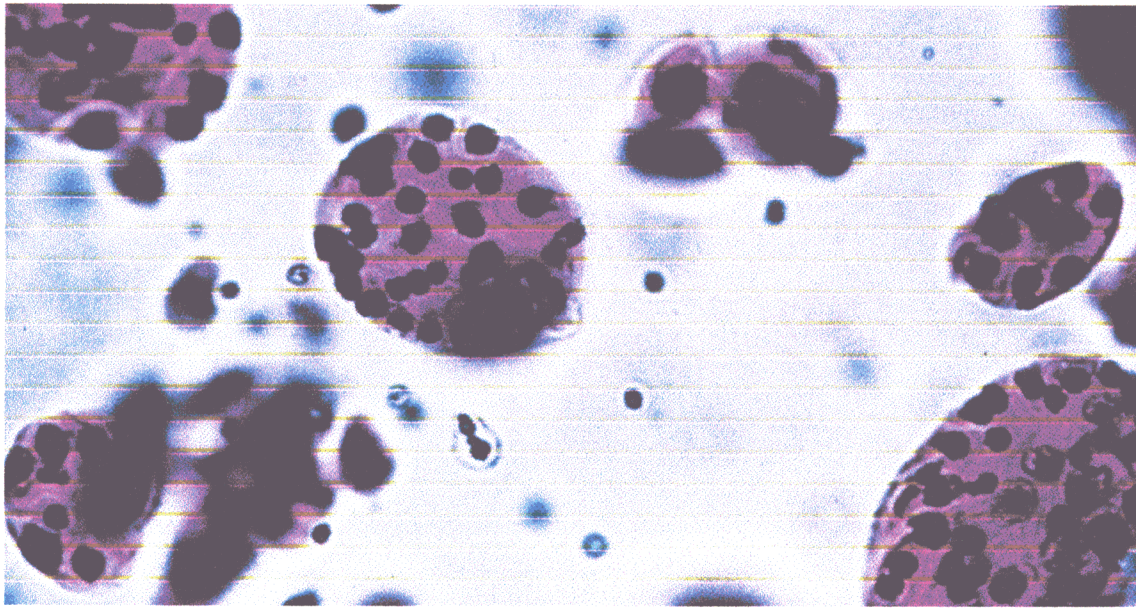
Existen actualmente pocos estudios sobre el cultivo de condrocitos humanos, debido sobre todo a la iatrogenicidad de obtención. El súbito interés surgido en la comunidad científica ortopédica debido a la posibilidad de reparación de lesiones condrales con condrocitos autónomos expandidos in vitro (PETERSON, 1996) ha estimulado la investigación en este terreno, hasta entonces escasa.

La obtención se realiza bien de las articulaciones diartrodiales recubiertos de cartílago, fácilmente obtenible rasurándolos con un bisturí, en cuyo caso son condrocitos maduros y diferenciados, o bien de la zona de crecimiento de los huesos largos de animales inmaduros, obteniéndose así condrocitos de mayor capacidad de reproducción, son los condrocitos de la placa de crecimiento. El aislamiento de los condrocitos se lleva a cabo mediante la incubación con distintas enzimas que digieren la matriz, siendo filtrados y centrifugados para eliminar residuos celulares. Desdichadamente, la simple exposición a enzimas proteolíticas puede dañar las células de mamífero (HEFLEY Y COLS., 1981; LAWS Y COLS., 1984). Para obtener el máximo número de células de una porción cartilaginosa es necesario llevar a cabo una digestión que permita aislarlas de la matriz extracelular sin lesionar su membrana. Los métodos publicados para el aislamiento de condrocitos se basan en la experiencia empírica e implican la exposición aislada, seriada o simultánea a varias enzimas. La concentración de las enzimas, duración de la digestión, composición del medio de digestión, si los recipientes donde se realiza deben ser o no agitados y otros detalles varían ampliamente de unos autores a otros. Las distintas técnicas deben ser evaluadas sobre la base del número de células obtenidas y al ritmo de crecimiento en cultivo.

Su cultivo se lleva a cabo en suspensión en el medio elegido en incubación a 37°C en estufa de CO₂. Los condrocitos son células redondas in situ y gradualmente, se aplanan, adoptando la morfología de fibroblastos, sobre la bandeja de cultivo, en un período que varía de 2 a 4 días. Este proceso, que se denomina desdiferenciación, es reversible. El crecimiento comienza tras este período quiescente inicial. En los cultivos confluentes, se observan dos patrones de crecimiento; algunas células en la bandeja crecen en monocapa mientras otras se apilan y forman nódulos. El número de estos nódulos aumenta con el aporte repetido de nutrientes. Si las células se tiñen entonces con azul de toluidina al 2%, se observa metacromasia en los nódulos, indicando que la síntesis activa de proteoglicanos ha comenzado.

FIG.26. Condrocitos en cultivo semi-sólido de agarosa, formando colonias.

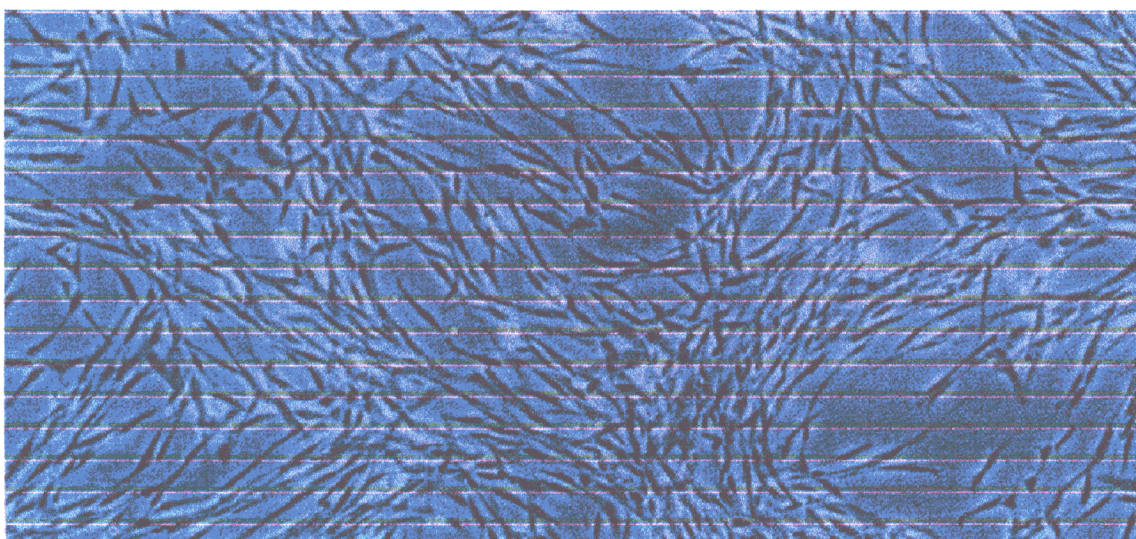




Mismo cultivo, teñido con safranina-O.

Los condrocitos no pueden ser mantenidos en los frascos de cultivo de forma indefinida una vez se han hecho confluentes, pues la síntesis de proteoglicanos sulfatados conduce a un descenso abrupto del pH del medio. Por ello las células se subcultivan en nuevos frascos con menor densidad celular. Para obtener las células para el subcultivo deben ser tripsinizadas de nuevo, para despegarlas unas de otras y de la bandeja de cultivo.

FIG.27. Condrocitos con fenotipo fibroblástico al confluir en placas.

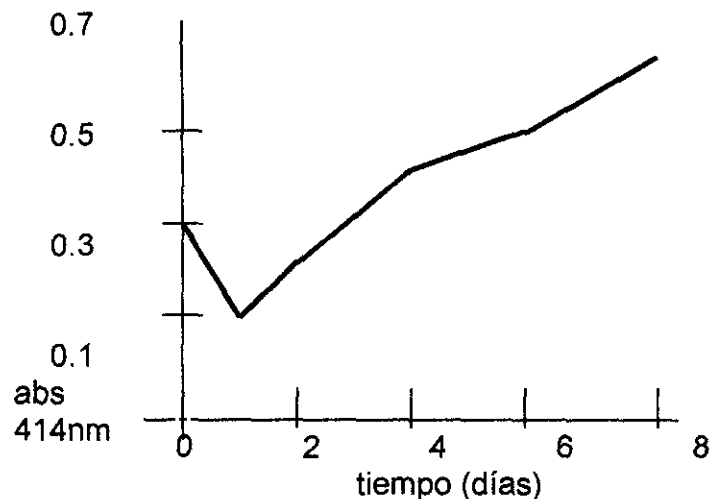


En general, los cultivos de condrocitos se caracterizan por varios criterios que incluyen una alta absorción de SO_4 y transformación de éste en condroitín sulfato, la tinción metacromática con azul de toluidina y la capacidad de los condrocitos de sobrevivir en cultivos en suspensión. Los condrocitos deberían ser la única célula capaz de sintetizar colágeno tipo II. Sin embargo, el tipo de colágeno producido por los condrocitos en cultivo se ha demostrado dependiente de las condiciones extracelulares. Como norma, los condrocitos en cultivos en monocapa producen colágeno tipo I (BENYA Y COLS 1978; BENYA Y SCHAFFER 1982) y en cultivos en suspensión, colágeno de tipo II. Sin embargo, cuando los cultivos en monocapa se manipulan, impidiendo la adhesión celular, tratándolos con citocalasina B o dejándolos crecer en gel de agarosa o alginato, los condrocitos se redondean y recuperan su fenotipo habitual (BENYA Y SCHAFFER 1982, BENYA Y BROWN, 1986, BASSLEER Y COLS, 1986 ; AULHOUSE Y COLS, 1989), apareciendo tras 3 ó 4 semanas formando colonias y rodeadas de un halo de matriz que rodea las células. Estos condrocitos reexpresan marcadores propios del cartílago, como los proteoglicanos sulfatados o la tinción con Safranina O. Este proceso de rediferenciación ocurre tanto *in vitro* como *in vivo* en la articulación, y parece ser la clave de la regeneración con éxito del cartílago articular mediante condrocitos autólogos cultivados, puesto que los condrocitos cultivados en monocapa proliferan rápidamente, mientras que los incluidos en matrices semisólidas forman grupos celulares y sólo las células situadas en la periferia muestran divisiones celulares. Los condrocitos situados en el centro de estas agrupaciones son pronto rodeados de matriz extracelular y entran en un periodo

quiescente. La síntesis de nuevo colágeno tipo II parece empezar a las dos semanas de la resuspensión (BARONE, 1996). Sin embargo, aunque con una tasa de proliferación menor, los condrocitos en cultivos tridimensionales son capaces de crecer y proliferarse en mayor medida que en el cartílago *in vivo*.

FIG.28.

Medida de la proliferación de los condrocitos en alginato usando Ac. monoclonales anti-bromodeoxyuridina que detecta la Uridina marcada que se incorpora al DNA celular. Se observa una caída de la proliferación el primer día, probablemente debida a la adaptación celular al nuevo medio.



El consumo de glucosa en las células en cultivo aumenta en relación directa con el tiempo transcurrido. Las células en gel muestran un consumo menor probablemente debido a la tasa metabólica restringida por el sustrato gel, por lo que esta forma de cultivo facilita el almacenamiento y el uso de las células en situaciones hostiles o inusuales (RAMDI Y COLS. , 1993).

De esta forma, el cultivo en monocapa permite la rápida expansión celular y los cultivos en agarosa permiten estudiar mejor determinados procesos, como la síntesis de proteoglicanos y colágeno tipo II.

El uso de alginato (polisacárido lineal compuesto por n moléculas de ácido L-manurónico + ácido D-glucurónico, que forma geles en presencia de calcio u otros cationes divalentes) ofrece la ventaja de poder ser solubilizado mediante la adición de quelantes y obtener las células sin precisar una nueva digestión enzimática, de modo que se pueden estudiar la distribución y renovación de los proteoglicanos en cultivos tan prolongados como de 8 meses (HAUSERLMANN Y COLS., 1994). Este método de cultivo ha permitido demostrar que los condrocitos mantienen su capacidad de sintetizar moléculas específicas del cartílago, tales como colágeno tipo II o proteoglicanos ricos en queratán sulfato. Los condrocitos mantenidos en monocapa sintetizan cantidades crecientes de colágeno tipo I y de proteoglicanos no agregantes (VON DER MARK, 1986). La importancia de este descubrimiento reside en la participación de los proteoglicanos agregantes (que incluyen fibronectina, laminina, vitronectina, fibrinógeno y colágeno tipo IX) en los procesos de adhesión celular a los substratos a través de proteínas receptoras de membrana específicas denominadas integrinas, a diferencia de los proteoglicanos no agregantes (trombospondina, tenascina, SPARC y dos clases del proteoglicano dermatán sulfato recientemente descritas : tipo I o biglicano y tipo II o decorina - ROSENBERG Y COLS., 1985-) que parecen inhibir las fases iniciales de la adhesión celular mediante enlaces covalentes con la fibronectina. La síntesis de ambos tipos de proteoglicanos por parte de los condrocitos explica su capacidad de supervivencia tanto en cultivos monocapa como tridimensionales. Su proyección en la práctica clínica consistiría en solucionar los problemas de unión entre la porción condral de los aloinjertos osteocondrales al cartílago receptor (ASTON Y BENTLEY, 1986 ; MALININ Y

COLS., 1985 ; MARCO, 1990) mediante la adición de sustancias estimuladoras de la adhesión celular como el heparán sulfato (HEREMANS Y COLS. 1990), la fibronectina (WEST Y COLS. , 1979), el ácido retinoico (BENYA Y PADILLA, 1986) y las citocalasinas B y D (ROSEN Y COLS. , 1986); o inhibición de los inhibidores con sustancias como la proteína central de los propios proteoglicanos del dermatán sulfato (BIDANSET Y COLS. , 1992), la vimentina (BEN-ZE'EV, 1984) y la colchicina (BROWN Y BENYA, 1988). El estudio de los efectos de estas sustancias en los cultivos de condrocitos ha llevado a la hipótesis de una trasducción entre la forma celular y el genoma celular a través del estado de organización de los microtúbulos (BENYA, Y COLS. , 1988). Esto ha permitido desarrollar cultivos de condrocitos en monocapa que aunque fenotípicamente aplanados, sigan sintetizando colágeno tipo II como los condrocitos diferenciados, mediante la adición de sustancias como ácido ascórbico, hidrocortisona, FGF, y otras, sin precisar de los cultivos tridimensionales (ADOLPHE Y COLS. , 1984; LAYMAN Y COLS. , 1972).

El cultivo de condrocitos humanos posee inconvenientes adicionales a los cultivos de otras células humanas, como tasas de infección que alcanzan del 25% al 68% (DI BARTOLOMEO Y COLS. ; 1990, TAYLOR Y COLS. ; 1994; CORLETT Y LACY, 1988), o la disminución de la viabilidad celular sin subcultivos. RAMDI Y COLS. demuestran en 1993 la disminución de la viabilidad condrocítica medida con el test de Azul tripán desde un 94.5% a un 67% en 7 días de cultivo.

El almacenamiento de los cultivos a 4°C durante 20 días arroja unas viabilidades del 60%, lo que sugiere este método como ideal para la preservación a largo plazo de los cultivos. El uso de estimuladores del

crecimiento y proliferación celulares, como el factor crecimiento transformador beta (TGF- β) puede ser útil en el mantenimiento de los cultivos a largo plazo. El efecto de este factor parece dependiente del tiempo de cultivo de los condrocitos además de mostrar una actividad dependiente de la dosis. Así, el TGF- β inhibe la síntesis de DNA y proteoglicanos en los condrocitos recién aislados cuando se halla en cantidades superiores a 1 ng/ml, mientras que estimula su proliferación y síntesis de componentes matriciales en los cultivos en monocapa y en concentraciones inferiores a 1 ng/ml, que es el máximo a partir del que, tiene menor efecto estimulante a mayor dosis (O'KEEFE Y COLS., 1988; HIRAKI Y COLS. 1988). En la clínica, este factor se encuentra en concentraciones muy elevadas (hasta 3.8ng/ml) en el líquido sinovial de las articulaciones artrósicas (FAVA Y COLS. ; 1989).

CULTIVO DE ORGANOS

El cultivo de cartílago intacto se puede considerar dentro de los cultivos de órganos. Estos, como ya hemos apuntado, consisten en la explantación y crecimiento in vitro de órganos o parte de ellos en los que los componentes del tejido, como el estroma y el parénquima, y su relación anatómica y función, se preservan de forma que el tejido explantado se asemeja mucho a su tejido de origen in vivo (LASNITZKI, 1995).

Fue LOEB (1897) el primero que cultivó fragmentos de hígado de rata, riñón, tiroides y ovario sobre coágulos de plasma dentro de un tubo de laboratorio encontrando que éstos mantenían su estructura histológica normal al menos 3 días. Este trabajo se adelanta en 10 años a la introducción de los cultivos de órganos por HARRISON (1907).

Los cultivos de órganos poseen el factor negativo de su corto período de vida. Incluso en las situaciones más óptimas, el cultivo de órganos no ha sobrepasado los pocos meses, y depende en gran medida del tejido cultivado.

CULTIVO DE CARTILAGO INTACTO

En el caso de cartílago intacto, se denomina en general tejido fresco a aquel que ha sido mantenido fuera de su lugar de extracción menos de 72 horas, y tejido conservado al que ha sido mantenido in vitro durante un período de tiempo mayor. Mediante técnicas de cultivo de tejidos, fragmentos de cartílago se han mantenido en medios de cultivo y con temperaturas por encima de los 0°C con la adición de varios aditivos nutricionales y antibacterianos, como vitamina E, aminoácidos esenciales, suero de ternera fetal, y otros, hasta 6 meses tras su extracción (BRIGHTON, 1979). Dada la importancia clínica de los injertos osteocondrales, piezas de cartílago con fragmentos de hueso

subcondral se han cultivado también con éxito (BLACK Y COLS. ; 1979), observándose además un descenso de la inmunorreacción siguiente al trasplante si el tejido osteocondral fue mantenido a 4°C (RODRIGO Y TRAVIS, 1987).

Como en otros tipos de tejido, el cartílago humano ha demostrado mantener su polaridad con el cultivo (LAFEBER Y COLS. , 1993), observándose una correlación lineal entre el contenido de glicosaminoglicanos, captación de $^{35}\text{SO}_4$ y contenido en DNA con el peso en seco de la muestra y con los días de cultivo transcurridos.

La elección del medio de cultivo es crucial para la supervivencia del cartílago. BULSTRA Y COLS. (1994) encuentran una inhibición del metabolismo condrocítico con tan sólo 1 hora de incubación de rótulas intactas de rata en distintos medios (suero salino, Ringer lactato, solución de Ringer, Ringer con 5% de glucosa y Betadine) a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 . Los porcentajes de inhibición metabólica con respecto a los controles (incubados en medio M199 con 10% de suero de ternera fetal, además de glutamina, ácido ascórbico, penicilina, anfotericina y estreptomycin) varían desde un 5% (solución de Ringer) hasta un 55% (Betadine, que además era la única solución que provocaba un reblandecimiento macroscópico del cartílago). Sin embargo, el cultivo de explantes de cartílago incubados en medio con suero de ternera fetal estimula la síntesis y disminuye la degradación de proteoglicanos de la matriz por parte de los condrocitos (CAMPBELL Y COLS. , 1984; HASCALL Y COLS. , 1983).

El cultivo de tejido osteocondral en óptimas condiciones, con cambios frecuentes del medio, permite mantener la viabilidad condrocítica y las

propiedades biomecánicas del injerto, haciéndolo adecuado para el trasplante y relleno de defectos. Si comparamos piezas de tejido mantenido en cultivo a 4°C durante 3, 7, 14 y 28 días, con piezas osteocondrales recién extraídas, destaca el mantenimiento de la arquitectura normal incluso con tinción de Safranina O (KWAN Y COLS. ; 1979) ; objetivándose como diferencia fundamental con los controles un aumento de la tinción pericelular. Este aumento de la coloración parece ser debido a una población más densa de glicosaminoglicanos alrededor de las células, aunque los resultados bioquímicos indican un contenido total de colágeno y glicosaminoglicanos semejante a las piezas frescas. La mayor parte del colágeno era tipo II y las células estaban vivas, con un aumento de la captación de ^{35}S con el tiempo. Estudios biomecánicos de las piezas almacenadas indican diferencias estadísticamente no significativas con respecto a los controles tanto en lo que a permeabilidad como rigidez de la matriz ante las cargas de compresión.

Aunque no son numerosas las referencias bibliográficas sobre los estudios in vitro de la capacidad de reparación del cartílago, SCULLY Y COLS. (1991) examinaron el potencial de cicatrización de explantes cartilaginosos mantenidos en cultivo. Así, objetivan un material de relleno acelular que se repuebla de células a las 3-6 semanas. Este proceso posee también una dependencia estrecha del medio utilizado, siendo una combinación de PBS, TGF- β 1 y BFGF el que se correlaciona con una mayor capacidad regenerativa. Basándose en estos resultados, REINDEL Y COLS. (1995) diseñan un modelo para el estudio del fenómeno de reparación in vitro, colocando dos piezas de cartílago intacto yuxtapuestas (con un área de contacto en ambas superficies de 4 x 5 mm) y en un sistema de cultivo, demostrando que el proceso de

reparación ocurre en la interfase de las dos piezas cartilaginosas y depende del metabolismo celular y del tiempo durante el que se mantiene el sistema en cultivo.

A estos estudios *in vitro* se añaden otros llevados a cabo por el mismo grupo (OATES Y COLS. , 1995) que prosiguen el experimento mediante la implantación en un modelo *in vivo* del tejido conservado en condiciones de cultivo, comparándolo con piezas semejantes en forma de autoinjerto y aloinjerto en fresco. Estos autores no encuentran diferencias significativas en cuanto al contenido de glicosaminoglicanos o propiedades biomecánicas en los distintos tipos de injerto tras 14 días de cultivo, aunque no han sido capaces de prolongar el experimento hasta 60 días. Los autores defienden el cultivo frente a otros métodos de conservación del cartílago hasta su implante. Este optimismo se justifica, frente a los resultados menos alentadores de otros autores (JIMENEZ Y BRIGHTON, 1983; BRIGHTON, 1990) por la falta de consideración de la reversibilidad de los cambios objetivados *in vitro* cuando los injertos se recolocan en su entorno sinovial normal. Otras razones aludidas para el fallo de los aloinjertos son defectos técnicos, inclusión de excesivo espesor de hueso subcondral en la pieza o trasplante de ambas superficies articulares, factores que experimentalmente se relacionan con una tasa de fallos mayor (PAP Y KROMPECHER, 1961; BEAVER Y COLS. , 1992; CONVERY Y COLS. , 1991).

• CRIOPRESERVACION DEL CARTILAGO

La reproducibilidad de resultados y la continuidad en la investigación de los procesos biomédicos depende, en gran medida, de la obtención de células vivas genéticamente estables. El cultivo celular seriado conlleva un gasto de tiempo considerable y puede complicarse con la contaminación o la mutación genética según se seleccionan porciones de la población celular inicial progresivamente más pequeñas. Estabilizar las células a temperaturas criogénicas, que, a efectos prácticos, detienen el tiempo, se denomina criopreservación.

La criopreservación es la técnica preferida para trasplantes en el sistema musculoesquelético, hematológico y reproductivo en humanos. Consiste en la congelación de tejido vivo para su almacenamiento y utilización posterior. La influencia de las temperaturas por debajo de 0°C en los tejidos orgánicos es estudiada por la criobiología, especialidad cuyo objetivo fundamental es el mantenimiento de la viabilidad celular en los tejidos durante su almacenamiento a bajas temperaturas.

Han pasado más de 40 años desde que se demostró la forma efectiva de congelar reversiblemente tejido biológico, realizándose por primera vez en espermatozoides (POLGE, 1949) y extendiéndose posteriormente su uso a eritrocitos (SMITH, 1950), cultivos celulares vegetales (LATTA, 1951), microorganismos (HECKLEY, 1978) y muchas otras especies y tejidos distintos.

Tanto los organismos uni o pluricelulares sufren lesiones más o menos reversibles cuando son sometidos a cambios de temperatura o a procesos de congelación. La destrucción de células y tejidos se ha limitado mediante el uso

de congelaciones programadas, ritmos de congelación controlados y el uso de agentes crioprotectores.

MECANISMOS DE LESION CELULAR EN LA CONGELACION

Los mecanismos por los que una célula es lesionada por los cambios de temperatura son sólo parcialmente conocidos, aunque se sabe que la lesión celular crioinducida tiene un origen multifactorial. A las lesiones provocadas por el descenso de temperatura, que se concentran fundamentalmente a nivel de la membrana celular, siendo éstas irreversibles alcanzado determinado punto, se añaden las lesiones provocadas por el cambio de estado del agua (MAZUR, 1984) y el estrés osmótico que conlleva.

Para la supervivencia de una célula o ser vivo a la congelación son necesarias tres condiciones básicas: que la formación de hielo sea controlada, que la estructura y función celulares, sobre todo su membrana, no sufran daños irreparables y por último, que la viabilidad celular se mantenga tras la congelación (STOREY Y STOREY, 1992).

Contrariamente a lo que se supone, el reto de las células durante la congelación no reside en la duración de su almacenamiento a bajas temperaturas sino el efecto letal que supone una zona intermedia de temperatura, situada entre -15 y -60°C aproximadamente, en la que la célula debe atravesar en dos ocasiones (durante la congelación y la sucesiva descongelación). No existen reacciones químicas en los sistemas acuosos a temperaturas de nitrógeno líquido (-196°C) puesto que el agua líquida no existe por debajo de los -130°C. El único estado físico que pueden tener lugar es el sólido, amorfo o cristalino, y en él, la viscosidad es tan alta ($> 10^{13}$ poises) que

la difusión es despreciable en tiempos inferiores a los geológicos (McGEE Y MARTIN, 1962).

En un sistema biológico acuoso, el fenómeno de la cristalización tiene lugar de forma preferente en el espacio extracelular. Todas las soluciones acuosas tienen un punto de congelación de equilibrio, que corresponde a la temperatura a la que un cristal de hielo colocado en la solución empieza a crecer. Pero todas las soluciones acuosas pueden ser también sobreenfriadas ; es decir, pueden enfriarse muy por debajo del punto de congelación de equilibrio sin que por ello el agua cristalice espontáneamente en forma de hielo. Así, el plasma humano tiene el punto de congelación a -8°C ; ahora bien, cuando lo enfriamos de forma controlada, puede ser sobreenfriado hasta -16°C . La velocidad de congelación, es pues, fundamental en el proceso de lesión celular crioinducida (MAZUR, 1977). Si la velocidad es demasiado rápida, producirá enfriamiento de las soluciones intracelulares y cristalización del hielo celular, factor más letal en este proceso. Así ocurre con la congelación rápida hasta -150°C , que provoca la microcristalización del espacio intracelular, mientras que la congelación progresiva hasta temperaturas comprendidas entre -15 y -60°C (que es el rango de temperaturas que alcanzan la mayoría de los congeladores comerciales) conduce a la formación de hielo extracelular que destruye las membranas citoplasmáticas y la arquitectura del medio extracelular.

Sin embargo, la presencia de nucleadores limita la extensión del sobreenfriamiento. Llámense nucleadores los compuestos que provocan el crecimiento del hielo al proporcionar puntos de enlace que ordenan las moléculas de agua en la estructura reticular del hielo. El propio hielo es el mejor

nucleador, pero las proteínas plasmáticas, bacterias extrañas y partículas alimenticias actúan asimismo como eficaces nucleadores.

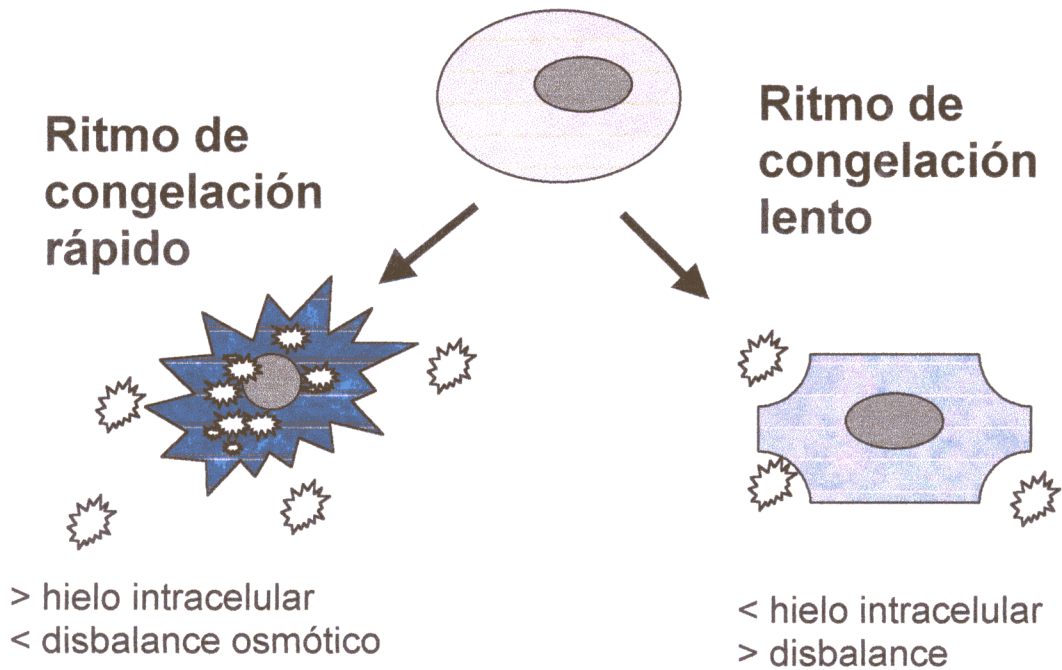
El comienzo de la formación de hielo en el fluido extracelular hace que el ritmo de congelación se mantenga lento y controlado y el tamaño de los cristales de hielo, relativamente pequeño. Los nucleadores actúan favoreciendo el control del proceso de cristalización. La acción de las proteínas nucleadoras del hielo asegura que el proceso de congelación inicial provoque la dispersión de miles de pequeños cristales de hielo, termodinámicamente inestables. Esta inestabilidad hace que los cristales de hielo tiendan a reconstituirse, con el tiempo o con un descenso mayor de la temperatura. La recrystalización da lugar a mayores cristales y a una lesión tisular más extensa. Esto explica que la supervivencia celular sea mayor a velocidades rápidas de descongelación pues se evita la recrystalización (MAZUR, 1970). La observación de insectos tolerantes a la congelación dio lugar al descubrimiento de la existencia de proteínas anticongelantes en estos animales, que controlan el tamaño de los cristales de hielo, y cuya existencia se predice en muchos sistemas biológicos. Así, la estructura del hielo es controlada por dos tipos de proteínas: las proteínas nucleadoras del hielo, que inician la formación de hielo extracelular y las proteínas anticongelantes, que estabilizan los cristales en un tamaño pequeño e inofensivo.

La membrana celular, semipermeable, que separa los compartimentos extra e intracelulares, permite el libre trasiego de agua y de algunos solutos, pero restringe el movimiento de otros compuestos, de modo que cuando se forma hielo fuera de las células, esto cambia el equilibrio de agua y solutos en el interior de aquellas (FARRANT, 1980).

El hielo es un cristal de agua pura. A medida que el hielo extracelular se va formando, excluye de su estructura solutos tales como sales, azúcares y proteínas. Así, el fluido extracelular restante se hace cada vez más concentrado. Este proceso supone un estrés osmótico para la célula (LOVELOCK, 1965), puesto que la concentración total de solutos a ambos lados de la membrana celular debe equilibrarse siempre, por lo que fluye agua del interior de las células y los solutos penetran en su interior.

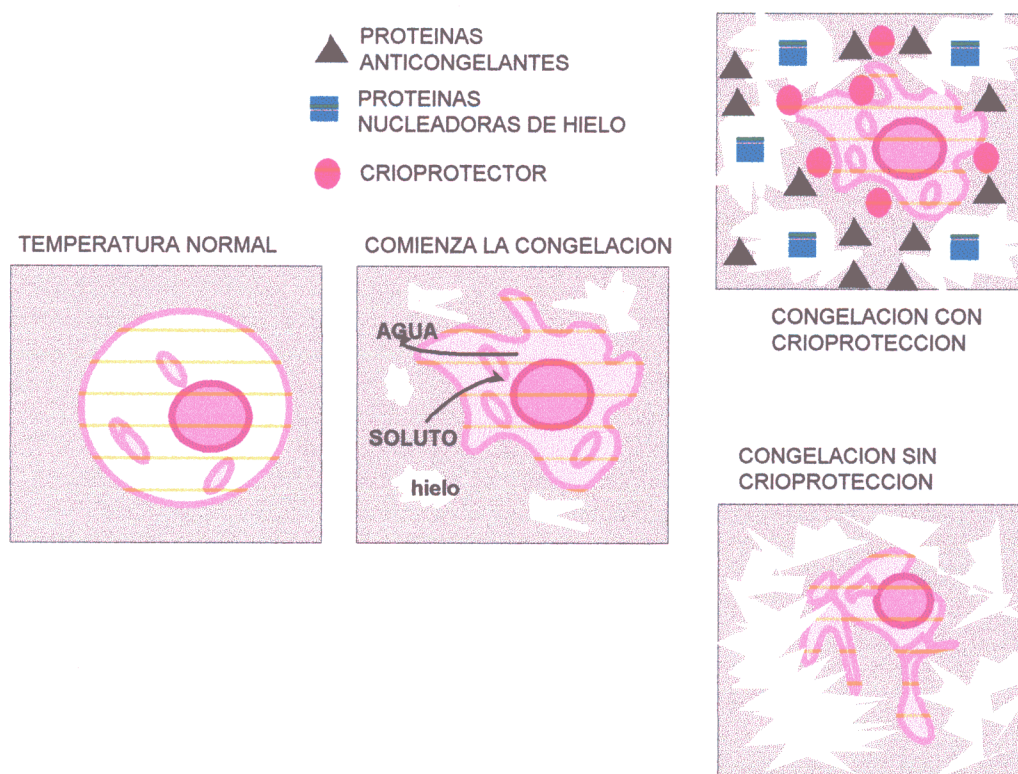
La lesión más grave durante la congelación afecta a la membrana celular, puesto que la salida de agua provoca un descenso del volumen celular. Si éste disminuye por debajo de un mínimo crítico, la bicapa de fosfolípidos de la membrana se comprime tanto que se rompe, perdiéndose las funciones de transporte y creándose una puerta de entrada para que el hielo se propague al interior celular al tiempo que se vierte el contenido celular al exterior. El volumen celular crítico para la mayoría de las células se alcanza cuando el 65% del agua se encuentra en forma de hielo (MARYMAN, 1971). Este volumen es bastante constante y depende únicamente de la presión osmótica externa, mientras que el ritmo en el que sucede la contracción celular depende intensamente de la temperatura y se calcula experimentalmente en un período de 2 minutos el tiempo que tarda la célula en responder al aumento de la presión osmótica externa mediante el flujo de agua intracelular (McGANN Y COLS., 1988).

FIGURA.29.



En cuanto al mantenimiento de la viabilidad celular, la detención metabólica que ocurre durante la congelación reviste una gran importancia en la recuperación subsiguiente. Durante la congelación, la tasa metabólica disminuye a valores bajísimos, del 1 al 10% de la tasa de reposo normal. La viabilidad celular que se precisa, como mínimo, tras un proceso de congelación y descongelación para dar como válido un determinado protocolo de congelación es del 50%.

FIG.30.



El ritmo de descongelación parece ser también un factor determinante de la viabilidad celular postcongelación. La mayoría de los autores (BANK, 1973; HARRIS Y GRIFFITHS, 1977; MAZUR, 1984) prefieren la descongelación rápida pues calentar las células de forma lenta podría permitir la recrystalización del hielo intracelular.

Los factores potencialmente dañinos para la célula en este proceso se pueden resumir así :

1. Reducción de la temperatura,
2. Efecto mecánico de los cristales de hielo extracelulares ;

3. Alteración de las propiedades físicas de la solución residual : pH, viscosidad, etc. ;
4. Generación de burbujas gaseosas y campos eléctricos en la interfase hielo-solución que pueden interactuar con la membrana ;
5. Concentración extracelular de solutos con efectos sobre el potencial de agua ;
6. Reducción de volumen del citoplasma ;
7. Concentración de los solutos citoplasmáticos y
8. Efectos de un citoplasma concentrado sobre los compartimentos intracelulares.

Las estrategias creadas para minimizar el daño producido por estos factores son:

1. El uso de crioprotectores ;
2. La utilización de protocolos de congelación que controlan la velocidad de enfriamiento.

CRIOPROTECTORES

Los agentes crioprotectores son compuestos que contrarrestan estas tensiones sobre la estructura celular. Tradicionalmente se dividen en dos grupos: 1. Los crioprotectores no penetrantes o de membrana interactúan con los fosfolípidos de la misma para extender la bicapa y estabilizar su estructura. 2. Agentes penetrantes: suelen ser de bajo peso molecular que evitan de diversas maneras las lesiones provocadas por los cambios de volumen durante la congelación, son también denominados coligativos.

- **CRIOPROTECTORES NO PENETRANTES O DE MEMBRANA.**

Son moléculas que pueden ejercer su acción protectora en pequeñas cantidades. Compuestos naturales que realizan esta función son la trehalosa y la prolina. Para SHIER (1988), la estabilización de las membranas celulares se produce por fluidificación de las mismas. Al aumentar la fluidez, los orificios producidos por los cristales de hielo que se propagan a través de las membranas pueden volver a sellarse durante el proceso de descongelación.

Su acción beneficiosa es óptima en los ritmos de congelación rápidos. La adición de un agente crioprotector extracelular reduce el ritmo máximo de congelación y aumenta el porcentaje de recuperación celular. En el caso de eritrocitos humanos, por ejemplo, se puede aumentar el ritmo de congelación hasta 20°C por segundo y conseguir un 97% de células viables al añadir polivinilpirrolidona (PVP) en una concentración tan baja como 3 mM (RINFRET Y COLS. , 1962). Otros compuestos con capacidad semejante son sacarosa, lactosa, glucosa, manitol, sorbitol o el polímero hidroxietil-almidón.

Las observaciones experimentales de MERYMAN (1971) sobre el aumento de la concentración intracelular de potasio en eritrocitos tratados con estas sustancias hace postular a este autor un segundo método protector al permitir un flujo reversible intra-extracelular de solutos durante la congelación y descongelación, con la contrapartida de incapacitar la defensa celular ante los efectos irreversibles de los gradientes osmóticos excesivos.

Este tipo de crioprotectores se utilizan de forma preferente como "criofijadores" de tejidos para su estudio estructural y microscópico. En este sentido presentan las ventajas de un bajo nivel de interferencia con las membranas y estructuras celulares y su acción rápida, de modo que con 15-30

minutos de incubación de la muestra, ésta se halla en condiciones de estudio (SKAER Y COLS., 1978).

• CRIOPROTECTORES PENETRANTES O COLIGATIVOS

Los crioprotectores coligativos ayudan a limitar, mediante la acción osmótica, la cantidad de hielo que puede formarse, el agua que las células pueden perder y, por tanto, la constricción del volumen celular durante la congelación. Actúan, por tanto, disminuyendo la temperatura de nucleación del hielo y son especialmente útiles en los ritmos de congelación lentos. Por ejemplo, en embriones de rata, esta temperatura desciende de -15°C en suero salino a -44°C en soluciones que contengan tanto DMSO como glicerol (RALL Y COLS., 1983). Este efecto tiene lugar gracias a la impermeabilización de la membrana al hielo extracelular (RULE Y COLS., 1980), la reducción o eliminación de los mecanismos heterogéneos de formación de hielo (RASMUSSEN Y MCKENZIE, 1972) y/o el mantenimiento de una distancia de seguridad entre la membrana plasmática y el hielo extracelular (RALL Y COLS., 1983). Dos inconvenientes al uso generalizado de estas sustancias son:

1. La penetración en las células debe ser uniforme y sin implicar mayores gradientes osmóticos en sí mismos,
2. Se requieren concentraciones multimolares de estas sustancias para llevar a cabo su acción crioprotectora (generalmente de 2 a 4 molar) por lo que resultan tóxicos para muchos sistemas celulares.

Los polihidroxialcoholes, como el glicerol, realizan esta función. Estas sustancias se encuentran de forma natural en la sangre de algunos anfibios tolerantes a la congelación, como la ranita arbórea gris (*Hyla versicolor*) y

fueron introducidos en la criopreservación por POLGE Y SMITH en 1949. Estos compuestos no cristalizan espontáneamente a bajas temperaturas y atraviesan las membranas con facilidad. Entre los crioprotectores artificiales destaca el dimetilsulfóxido (DMSO), que ofrece una protección física excelente, aunque presenta efectos tóxicos sobre el metabolismo celular. En las temperaturas cercanas a la congelación, estos compuestos actúan como moléculas intracelulares adicionales, ejerciendo un efecto físico o coligativo, aumentando la concentración de solutos intracelulares y reteniendo agua dentro de la célula y aumentando su viscosidad, lo que previene la disminución brusca del tamaño celular (MERYMAN Y COL, 1977). La supervivencia celular mediada por el agente crioprotector se produce al mantener el estrés osmótico dentro de los límites tolerables (TAKAHASHI Y COL, 1988), propiedad que ostenta el DMSO debido a su alta afinidad para puentes de hidrógeno (DOEBBLER Y RINFRET, 1962). Estas uniones retendrían el agua en la célula durante más tiempo conservando un medio intracelular más normal durante la congelación.

El mejor grado de protección para los sistemas celulares de mamíferos se ha conseguido utilizando DMSO o glicerol al 5-10%. Tanto para el DMSO como para el glicerol se atribuyen ciertas propiedades de estabilización de membrana, semejante a las de los crioprotectores no penetrantes, además de las coligativas propias (LEIBO Y COLS., 1970).

Parece ser que el DMSO difunde a través de las membranas celulares con mayor rapidez combatiendo el gradiente osmótico en la congelación y también en la dilución por descongelación, compensando el shock por dilución debido a la hipotonicidad creciente del medio (ASHWOOD SMITH Y COL. 1964).

La toxicidad de este compuesto parece deberse a su actuación sobre los sistemas enzimáticos intracelulares (SCHLAFFER, 1977) y las membranas celulares (WEINER Y COL., 1972).

El glicerol, sin embargo, resultó experimentalmente mejor tolerado en la congelación del cartílago en un estudio llevado a cabo en nuestro Departamento (MARCO Y COL., 1990). A elevadas concentraciones, puede tener también un efecto letal por la variación que produce en los potenciales eléctricos intracelulares (BAKER Y SCHORK, 1972). Su principal inconveniente reside en la lentitud de su difusión a través de las membranas celulares y la cantidad de tejidos que parecen impermeables a esta sustancia.

TECNICAS DE CRIOPRESERVACION

Los distintos tipos celulares se ven alterados en forma variable en función del tiempo de exposición, temperatura y concentración del crioprotector (KAROW, 1974).

TABLA.5.

TIPO CELULAR	NUMERO CEL.	CRIOPROTECTOR	MIN. T° ALMACENAMIENT O
Bacterias	10^7 /mL	Glicerol al 10%	-60°C
Bacteriófagos	10^8 pfu/mL	Glicerol al 10%	-60°C
Hongos	10^6 /mL	Glicerol al 10%	-150°C
Levaduras	10^7 m/mL	Glicerol al 10%	-150°C
Protozoos	10^5 - 10^7 /mL	DMSO (5-10%) o Glicerol (10-20%)	-150°C
Algas	10^5 - 10^7 /mL	DMSO (5-10%)	-150°C

Cél. Vegetales	*	DMSO (5-10%)+ Glicerol al 10%	-150°C
Cél. Animales	$10^6 - 10^7$ /mL	DMSO (5-10%) o Glicerol al 10%	-150°C
Virus vegetales	10^6 /mL	NINGUNO	-150°C
Virus animales	10^6 /mL	DMSO (7%)+ FBS(10%)	-150°C
Plásmidos	10^6 /mL	Glicerol al 10%	-150°C

* las células vegetales se "empaquetan" hasta 3-20% de su volumen para ser congeladas.

La viabilidad y una estimación del porcentaje de recuperación se deben determinar tanto antes como después de la congelación. La viabilidad es una medida de la capacidad de un cultivo celular u organismo de crecer y reproducirse, resultando la mayoría de las veces inferior al porcentaje de células recuperadas, puesto que éstas pueden estar dañadas aunque vivas.

El porcentaje de células viables postcongelación y descongelación está determinada por varios factores:

1. Ritmo de congelación y descongelación (MAZUR, 1970),
2. Especie y tipo celular (KAJARAMAN Y COLS., 1974),
3. Fase del ciclo celular en que se encuentren las células en el momento de la exposición (KOCH Y COLS., 1970),
4. Tipo de sustrato celular (HETZEL Y COLS., 1973),
5. Número inicial de células e interacciones entre ellas (McGANN Y COLS., 1972).

Para la mayoría de las células de animales mamíferos, se requiere una concentración celular inicial del rango de 10^6 - 10^7 /mL (HAY, 1978). Las células deben estar en suspensión y en una concentración doble de la indicada para la preservación de modo que al añadir un volumen igual de criopreservante (2 x agente crioprotector + medio) se pueda alcanzar las densidades celulares deseadas. De forma alternativa, el centrifugado celular se puede resuspender en el crioprotector (1 x crioprotector + medio).

El período de tiempo entre la mezcla del crioprotector con la suspensión celular y el comienzo del enfriamiento se denomina "período de equilibrio". Para la mayoría de las células, el equilibrio sucede en un mínimo de 15 minutos y máximo de 45-60. Si este tiempo es demasiado largo, el crioprotector aumenta su toxicidad hacia las células. El período de equilibrio tiene lugar a temperatura ambiente para facilitar la penetración del agente.

Tras el equilibrio se procede al enfriamiento de la muestra. Ya hemos señalado la importancia del ritmo de congelación que afecta el ritmo y tamaño de los cristales formados, así como a los fenómenos osmóticos. Diferentes células pueden necesitar distintos ritmos de congelación, pero un ritmo uniforme de -1°C por minuto desde la temperatura ambiente es efectivo para una gran variedad de células.

Generalmente, cuanto mayores son las células, más crítico se vuelve el ritmo lento de congelación. La mayor parte del agua presente en el sistema se congela entre -2 y -5°C . El cambio de estado de líquido a cristalino tiene como resultado la liberación de energía en forma de calor; esto se denomina "calor latente de fusión". Esto conduce al calentamiento de la muestra hasta que se vuelve a alcanzar el punto de congelación de equilibrio. Para minimizar los

efectos deletéreos de este fenómeno, se debe evitar el calentamiento mediante el "sobreenfriamiento" de la muestra de forma artificial (SIMIONE Y DAGGETT, 1977). Este proceso de ritmo lento y sobreenfriamiento hace necesario el uso de un congelador programable que permita controlar la curva de enfriamiento y repetir los experimentos con fiabilidad.

El almacenamiento de las preparaciones congeladas se puede hacer a distintas temperaturas bajo 0°C, estando la longevidad de la muestra determinada por la temperatura del mismo. Así, cuanto más baja sea la temperatura de almacenamiento, mayor es la duración del almacenamiento viable (MAZUR, 1984). La estabilidad de las células congeladas no se puede asegurar por encima de -130°C. Algunas bacterias y hongos formadores de esporas pueden tolerar temperaturas de almacenamiento de -60 a -80°C, pero las células de mamíferos requieren temperaturas inferiores.

La descongelación debe ser rápida para la mayoría de las células. Para conseguir este calentamiento desde el estado congelado se sumergen las cápsulas o viales donde se congelan las muestras en un baño de agua a 37°C. Tras conseguir la descongelación completa, las muestras se deben transferir a medio de crecimiento fresco para minimizar el tiempo de exposición al agente crioprotector. En algunas ocasiones, es necesaria la dilución mediante centrifugación para eliminar el crioprotector residual.

La determinación de la viabilidad celular se puede llevar a cabo mediante distintos métodos. El más utilizado de ellos es el test de exclusión de azul tripán, que se basa en la integridad de membrana, tiñéndose con el colorante las células carentes de membrana impermeable (no viables) y siendo visibles mediante microscopía. El porcentaje de células viables se halla fácilmente:

$$\% \text{ células viables} = \text{células viables (no teñidas)} / \text{células totales} \times 100$$

El principal inconveniente de esta técnica es la sobreestimación de las células viables, como fue señalado por LOPEZ-OLIVA (1993), puesto que la integridad de membrana no asegura la capacidad de crecimiento y reproducción que define el concepto de viabilidad. Este autor, siguiendo a BELL Y COLS. (1986) propone la determinación de ésta mediante citometría de flujo.

Otras técnicas de determinación de la viabilidad son indirectas, a través de la medición del metabolismo celular (captación de sulfuro³⁵S o 3H-hidroxiprolina), o determinaciones bioquímicas, que implican siempre la destrucción de la muestra analizada.

CRIOPROTECCION DEL CARTILAGO ARTICULAR

En los estudios de criopreservación del cartílago articular hay que distinguir dos conceptos muy distintos:

1. Congelación de condrocitos aislados:
2. Congelación de piezas de cartílago íntegro.

CONGELACION DE CONDROCITOS AISLADOS

En un estudio clásico de TOMFORD, FREDERICKS Y MANKIN (1985) determinan de forma precisa la toxicidad de los crioprotectores sobre los condrocitos concluyendo que :

1. El DMSO es tóxico para los condrocitos, aumentando la toxicidad al tiempo que aumenta la concentración del crioprotector más allá del 12% y con exposiciones superiores a los 90 minutos.
2. El glicerol resulta ser tan tóxico como el DMSO. Esta toxicidad disminuye al enfriar el agente, pues se mejora la supervivencia celular cuando la temperatura disminuye de 37 a 4°C.
3. Los condrocitos congelados y descongelados muestran un choque térmico que se traduce en una incapacidad para sintetizar glicosaminoglicanos durante 72 horas. El cultivo posterior de estas células muestra resultados semejantes al cultivo de células en fresco.
4. La viabilidad celular tras el proceso es mayor cuando se utilizan protocolos de congelación lentos.

5. Los resultados con condrocitos aislados no son aplicables al cartílago intacto debido a la irregular penetración del crioprotector a través de la matriz cartilaginosa.

• PRESERVACION DE CARTILAGO INTACTO

El cartílago intacto, por su estructura y diferenciación, actúa como un órgano entero en cuanto a su criopreservación. El almacenamiento de órganos enteros durante largos períodos de tiempo para su siguiente trasplante requiere igualmente el uso de temperaturas bajo cero y de crioprotectores. Sin embargo, la aplicación directa de los procedimientos de crioconservación convencionales, incluyendo la perfusión de una concentración única e inicial de crioprotector, seguida de enfriamiento lento hasta -80 ó -196°C , ha obtenido resultados muy poco esperanzadores (DIETZMAN Y COLS., 1973; HALASZ Y COLS., 1967).

La crioconservación de órganos enteros encuentra un obstáculo importante en el aumento de la resistencia vascular provocado por los efectos osmóticos de los crioprotectores. La perfusión de riñones de conejo con glicerol 2 M, por ejemplo, colapsa por completo la luz vascular al reperfundirlos con medio libre de glicerol (PEGG, 1973). Este problema es inexistente en el caso del cartílago articular, por su estructura avascular, de forma que, su inclusión en soluciones con concentraciones variables de crioprotectores elude el uso de sofisticados sistemas de perfusión intratisular.

La ventaja que representa el uso de cartílago articular criopreservado frente a los injertos en fresco es una aparente disminución de la inmunogenicidad y de la respuesta injerto-huésped (CURTISS Y COLS., 1959;

LANGER Y GROSS, 1974; SCHACHAR Y COLS., 1989) aparte de las ventajas de biodisponibilidad y detección de enfermedades transmisibles.

El cartílago articular intacto utilizado para trasplante se suele utilizar en forma de aloinjertos osteocondrales, manteniéndose el tejido adherido a una fina capa de hueso subcondral, que permite un mejor anclaje posterior.

El crioprotector preferido en la bibliografía internacional para la conservación bajo 0°C del cartílago es el dimetilsulfóxido en concentraciones variables, entre 5 y 15%. A pesar de ello, MARCO (1990) encuentra mejores resultados con la utilización de glicerol como preservante. El período de equilibrio se prefiere hacer a 4°C durante 1 hora, puesto que parece disminuirse a esta temperatura el efecto citotóxico del DMSO (SCHACHAR Y MCGANN, 1986).

• PROTOCOLOS DE CONGELACION

Un error de concepción frecuente en la criobiología es universalizar un método de crioconservación adecuado para una línea celular o especie a todas las células u organismos semejantes. Una biología distinta condiciona una respuesta diferente a los crioprotectores y a la congelación en general.

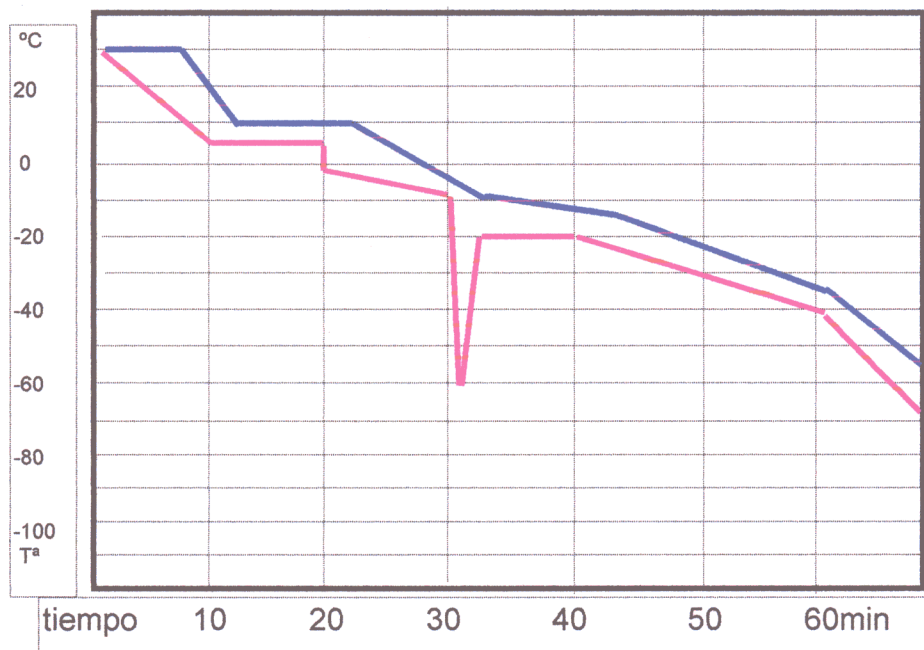
La formulación de protocolos de congelación está basada en estudios empíricos, hasta la optimización del ritmo de congelación de cada estirpe celular. La mayoría de las líneas celulares de mamíferos, como hemos señalado, precisan de un enfriamiento lento y progresivo, a un ritmo de -1 a -3°C/min, y una descongelación rápida. La optimización de los protocolos de crioconservación del cartílago humano ha sido una de las líneas de investigación de nuestro departamento, llegándose a la conclusión de que el

mejor protocolo para el cartílago intacto es un ritmo de congelación de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, con un choque térmico de -60°C cuando el tejido llega a su punto de cristalización, que experimentalmente se situó en -8°C , para contrarrestar el aumento brusco de temperatura de la muestra debida al calor de fusión (LOPEZ-OLIVA, 1993). Con este protocolo, se alcanzan viabilidades del 50% tras la descongelación, medidas mediante citometría de flujo.

Otras técnicas de determinación de la viabilidad condrocítica tras la congelación, más fiables que el test de exclusión de azul tripán y que informan sobre su estado metabólico son la captación de ^3H -hidroxiprolina y ^{35}S , y estudios bioquímicos sobre el contenido de agua, hidroxiprolina, hexosamina y ácido urónico. La captación de ^{35}S informa sobre tasa de recambio de los proteoglicanos mientras que la prolina está implicada en el proceso de reparación del colágeno. El contenido de hexosamina es indicador del número total de proteoglicanos y el contenido de ácido urónico, por su parte, señala el contenido de condroitín-sulfato. Todos estos indicadores indirectos de la viabilidad condrocítica aunque presentes, aparecen disminuidos con relación a autoinjertos controles (SCHACHAR Y COLS:, 1992) indicando funcionalidad del tejido, hasta 1 año después del trasplante en animales de experimentación.

FIGURA.31.

Choque frío que compensa el calor de fusión



Temperatura del congelador

Temperatura de la muestra

Estos resultados son superponibles a los obtenidos por otros autores (TOMFORD Y COL., 1985 ; SCHACHAR Y COL., 1986) y son mejorados, como ya hemos comentado, por las viabilidades obtenidas tras congelación de condrocitos aislados en suspensión, que alcanzan un 90% de viabilidad postcongelación (TOMFORD Y COL. 1985). Estas diferencias se atribuyen a la penetración variable del crioprotector a través de la matriz extracelular cartilaginosa.

• PRINCIPIO DE LA RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

DEFINICION E IMPORTANCIA BIOMEDICA

La resonancia magnética nuclear consiste en detectar las variaciones de estado energético de los núcleos de una sustancia bajo la acción de campos magnéticos estáticos o variables y de ondas de radiofrecuencia.

La resonancia magnética nuclear como técnica de imagen (IRM) aplicada al diagnóstico clínico, ha sufrido un ascenso vertiginoso en los últimos años, considerándose imprescindible en el diagnóstico de muy diversas patologías, sobre todo en el Sistema Nervioso y Sistema Músculo-Esquelético. Su éxito se debe a muchos factores entre los que debemos citar en primer lugar; poder obtener imágenes tomográficas fácilmente interpretables. Es además la técnica con la que podemos obtener un mayor contraste tisular, sobre todo en tejidos blandos. Esto radica en la esencia misma del fenómeno de resonancia magnética, sensible a las variaciones en las estructuras bioquímicas, además de ofrecer la posibilidad de manipulación de la señal de forma que nos permita objetivar distintas características intrínsecas de los tejidos estudiados.

El principio de la RMN es publicado simultáneamente por dos equipos americanos en 1946. Por este descubrimiento, BLOCH Y PURCELL recibieron en 1952 el Premio Nobel de Física. El gran auge de la RMI dejó en segundo lugar en el campo médico sus posibilidades como instrumento de análisis bioquímico, que fue su punto de arranque. El desarrollo de los imanes actuales permiten realizar análisis espectroscópicos "in vivo", estudiando de forma directa algunos procesos metabólicos sin interferir en ellos ni utilizar técnicas agresivas. La Espectroscopía por Resonancia Magnética (ERM) aplicada "in

vivo” es una herramienta de trabajo en fase de exploración y que ofrece enormes posibilidades en el diagnóstico médico. Prácticamente desde su descubrimiento, los químicos han utilizado la RMN como una técnica rutinaria para el análisis estructural de los compuestos. Posteriormente, se extendió al campo de la bioquímica y, en 1957, se publicó el primer estudio mediante RMN sobre la estructura de una macromolécula, la ribonucleasa. El desarrollo de la RMN como técnica tomográfica surgió en 1973 debido a una idea de LAUTERBUR, quien, utilizando gradientes magnéticos y análisis de frecuencia, logró la primera imagen tomográfica. Los años posteriores fueron de un gran desarrollo tecnológico, tanto en el aspecto informático como en el desarrollo de potentes imanes como los que se utilizan en la clínica actual, de 1.5 Tesla.

BASES FISICAS DE LA RMN

Se conoce desde hace siglos la propiedad de ciertos cuerpos naturales (como el óxido de hierro, Fe_3O_4), llamados imanes, de atraer partículas de limaduras de hierro. Esta propiedad se manifiesta por la aparición de fuerzas que no pueden explicarse por la interacción gravitatoria ni por la interacción electrostática. Es, pues, necesario introducir un nuevo tipo de interacción a distancia, la *interacción magnética*. Las interacciones magnéticas y las electrostáticas representan dos aspectos diferentes de los efectos de las cargas eléctricas.

Así, las propiedades magnéticas de la materia dependen de las propiedades de sus constituyentes atómicos, electrones y núcleos, partículas cargadas que por sus movimientos crean campos magnéticos. El espacio es,

pues, la sede de un campo de fuerzas electrostático creado por las cargas en reposo y de un campo magnético cuando se desplazan.

Desde los años 20, se sabía que muchos núcleos atómicos tenían un momento angular derivado de su propiedad intrínseca de rotación, el *spin*, s . El spin es una propiedad fundamental de la naturaleza como puede ser la carga eléctrica o la masa. Por estar los núcleos eléctricamente cargados, el spin corresponde a un flujo de corriente en torno al eje de giro, que genera a su vez un pequeño campo magnético, de manera que los núcleos con propiedad de spin se comportan igual que una pequeña pila o imán, con un polo N y otro S. Las características de este imán se representan por medio de un vector llamado "*momento magnético*" M , que define simultáneamente la dirección y sentido del eje magnético de orientación de cada pequeño imán y su grado de magnetización. Estos dos vectores no son independientes, sino que para un determinado núcleo se cumple

$$M = \gamma \cdot s$$

(donde γ es el cociente giromagnético nuclear que depende de la carga/masa, característico de cada tipo de núcleo).

En ausencia de un campo magnético externo, los momentos magnéticos de los protones estarán orientados de forma aleatoria. La suma de los momentos magnéticos individuales se conoce como *magnetización neta*.

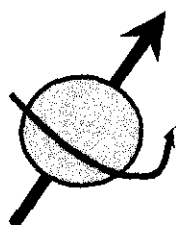
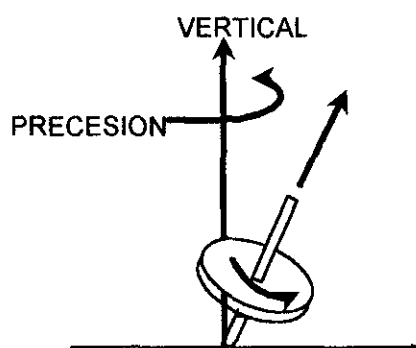
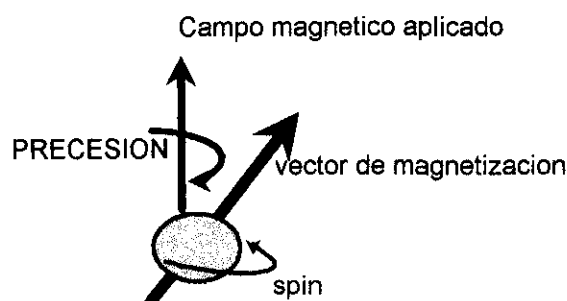


FIG.32.Momento magnético

Para entender un experimento de RMN, podemos hacer una comparación: los núcleos en rotación se comportan de forma similar a pequeños giroscopios. Si se inclina el eje en rotación, alejándolo de la vertical, el giroscopio describirá un movimiento semejante a la pared de un cono. Este movimiento recibe el nombre de *“precesión”*. Asimismo, si la magnetización neta de un conjunto de núcleos en rotación en un campo magnético, se aleja de la dirección de su eje, este momento magnético global efectuará un movimiento de precesión alrededor de su propio eje. Si aplicamos un campo magnético externo muy intenso y perpendicular al campo estático, conseguimos esta inclinación. Para inclinar el vector del spin macroscópico y alejarlo de su eje, la frecuencia de radiación electromagnética debe ser igual a la frecuencia de la precesión natural de los núcleos de la muestra, de ahí la expresión *“resonancia magnética nuclear”*. De la misma forma que en un conjunto de diapasones de diferente frecuencia, podemos hacer vibrar uno específicamente emitiendo una onda en una determinada frecuencia, y el diapason de esa determinada frecuencia “resonará” al sintonizarse con ella, es como, mediante una selección apropiada de la frecuencia, pueden sintonizarse especies nucleares específicas y observar su respuesta individual.

FIG.33.





Dicho de otra forma, el momento magnético de una población de núcleos colocados en un campo magnético constituye un verdadero oscilador, caracterizado por una frecuencia propia. Al someter este oscilador a la acción de una onda electromagnética, absorbe energía y esta absorción es máxima cuando la frecuencia de la onda es igual a la frecuencia propia del oscilador. La energía absorbida por el sistema magnético es enseguida disipada por relajación, lo cual hace al fenómeno observable

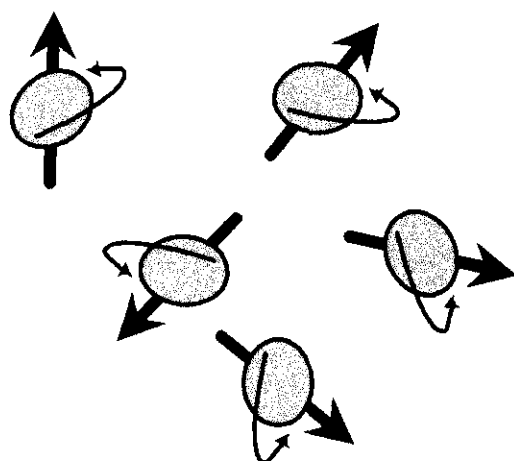


FIG.34. Orientación al azar de los spins en ausencia de campo magnético

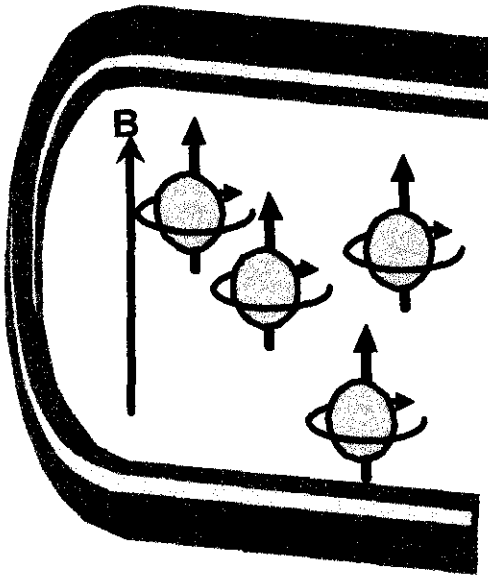
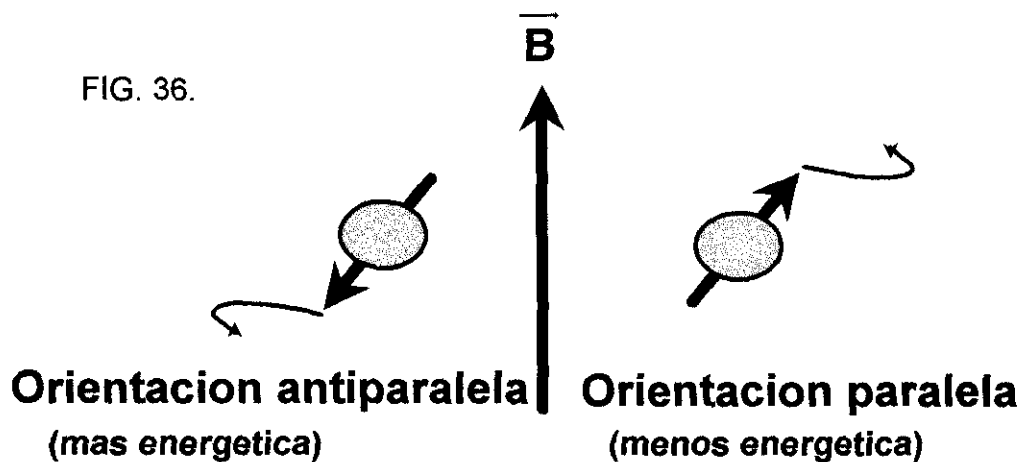


FIG. 35.

Movimientos de precesión de los espines bajo un campo magnético

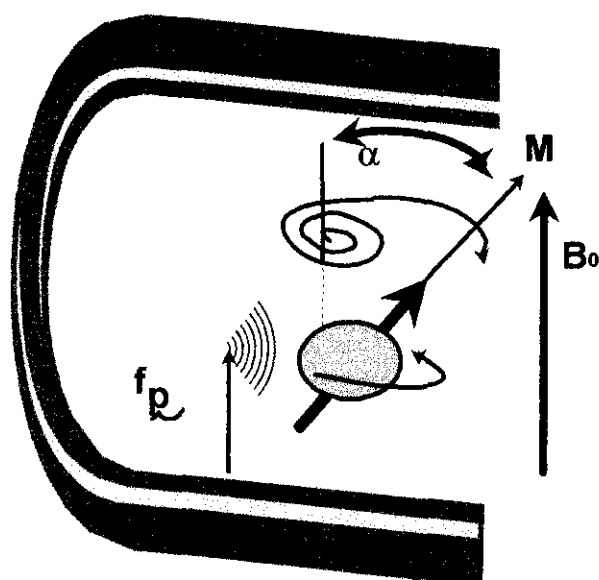
Aplicando un campo magnético externo, B_0 , se produce una orientación de los momentos magnéticos particulares de cada protón, de forma paralela o antiparalela a la dirección de este campo. La orientación paralela es un estado de menor energía, por lo que el número de protones que se orientan de esta forma es mayor, y esto hace que la magnetización neta sea de la misma dirección que el campo magnético externo. Existe por tanto, una relación directa entre la distribución de los núcleos y el valor del campo magnético B_0



Si creamos un campo magnético perpendicular al principal, mediante una onda de radiofrecuencia, los núcleos y, por tanto, la magnetización neta, se orientarán en dicha dirección.

El ángulo de desplazamiento α entre el vector de magnetización global y la dirección del campo magnético estático, aumenta de forma continua durante todo el tiempo que se aplica la onda de radiofrecuencia. La tasa y el incremento de este cambio dependen de la potencia del campo. Esto constituye el “*ángulo de inclinación o flip angle*” y así se llama “*pulso de 90°*” al que tiene las características necesarias para inclinar el momento global desde su posición inicial hasta que gire justamente en un plano perpendicular. La duración del pulso de radiofrecuencia determina la magnitud de la rotación del vector de magnetización global con respecto a su alineación original. Por ejemplo, un pulso de 90° produce una rotación de 90°, y de manera similar, un pulso de 180° produce una rotación de 180°.

FIG.37.



Movimiento del vector de magnetización al entrar en resonancia con la emisión de ondas electromagnéticas de frecuencia ν .

Inmediatamente después de aplicar un pulso de 90° , el vector de magnetización global continúa girando libremente en el plano perpendicular, de forma que genera una pequeña fuerza electromotriz, detectable por la misma bobina o por otra bobina receptora. La señal emitida se denomina “*señal de inducción libre*” o “*amortiguación de inducción libre*”. En términos mecánico-cuánticos, es la señal que se produce al caer los núcleos del nivel energético excitado al estado fundamental o nivel de menor energía.

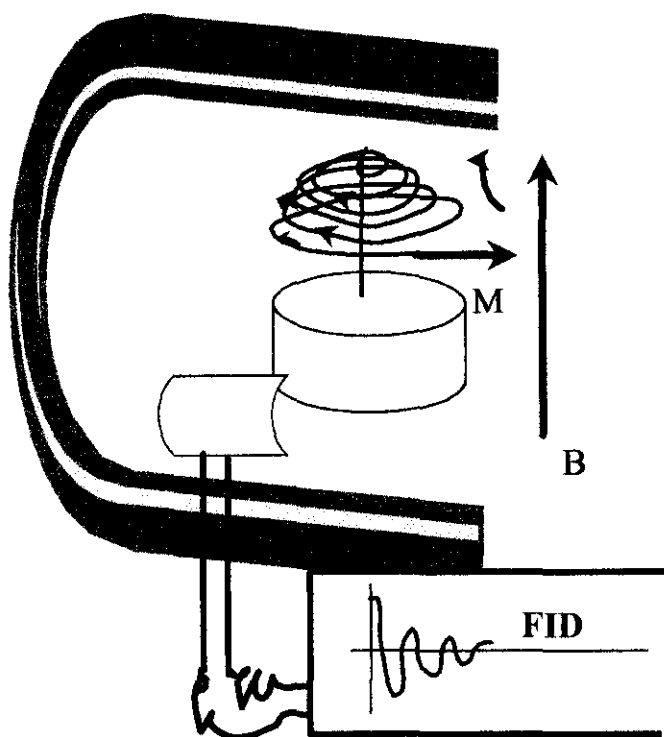


FIG. 38.

Finalizado el pulso de excitación, el valor de magnetización global acabará por volver a su posición original. Esta vuelta al equilibrio se debe a numerosas interacciones, entre los núcleos excitados o entre ellos y el resto de la materia. Estos fenómenos están regidos por la ley del azar, y su evolución temporal puede describirse por una ley exponencial. El retorno al equilibrio se caracteriza por dos tiempos principales de relajación : T1 y T2

Tiempo de relajación T1

Llamado también tiempo de relajación spin-red, spin-medio, spin-látex o longitudinal, corresponde al retorno al estado inicial por transferencia energética entre el sistema de espines y el medio del entorno llamado red. Es la constante de tiempo en el movimiento de retorno al equilibrio del vector de magnetización macroscópica después de un pulso.

Tiempo de relajación T2

Tiempo de relajación spin-spin o transversal, caracteriza las interacciones entre los diversos espines de la muestra. Traduce la pérdida de coherencia de fases entre los espines después de parar el campo magnético externo aplicado. Cada núcleo genera un campo magnético que afecta a sus núcleos vecinos. Si esta relación es alterada por la aplicación de un campo externo, entran en fase de coherencia. El retorno a la fase de incoherencia que caracteriza el estado de equilibrio está señalado por la constante de tiempo T2 que caracteriza la velocidad de desaparición de la magnetización macroscópica en el plano xy después de un pulso.

IMAGENES POR RESONANCIA MAGNETICA

El principio de la obtención de imágenes por RMN es crear una codificación espacial que permita atribuir a cada señal su lugar en un plano o en un volumen y, de esta forma, reconstruir las imágenes. En la rutina clínica, pedir una RM significa obtener una serie de cortes tomográficos por resonancia magnética de los núcleos de H^1 .

Para realizar la imagen tomográfica, el ordenador recogerá la señal que proviene de los distintos elementos de volumen (*vóxeles*) en que se supone dividido al paciente. Los *vóxeles* se definen por la matriz de adquisición y el espesor del corte. La imagen por resonancia magnética está compuesta por varios elementos pictóricos denominados *pixeles*, en los que la intensidad de cada pixel es proporcional a la intensidad de señal de RMN del contenido del *vóxel* correspondiente del objeto sometido a estudio.

La idoneidad de esta técnica en la práctica clínica se debe sencillamente a que el cuerpo humano está compuesto principalmente por agua y grasa. Estos dos componentes tienen muchos átomos de hidrógeno que hacen al cuerpo humano compuesto de hasta el 63% de átomos de hidrógeno.

Al colocar a un individuo bajo un campo magnético B_0 , en cada uno de sus *vóxeles* aparecen, debido a los núcleos de hidrógeno, propiedades magnéticas que definen la magnetización del *vóxel* M , que es también una magnitud vectorial orientada en la dirección del campo magnético B_0 . El valor de M depende de la densidad de núcleos de H que se encuentren en el *vóxel*.

En estas condiciones, si sometemos el *vóxel* a ondas electromagnéticas de radiofrecuencia RF y vamos variando la frecuencia de emisión, observamos

que a una frecuencia determinada, el vector de magnetización se desvía de su posición de equilibrio. Diremos entonces que se ha producido el fenómeno de resonancia, es decir, que los núcleos de H han entrado en resonancia con la emisión de radiofrecuencia, cuyo valor concreto se denomina f_r , *frecuencia de resonancia*. El valor de f_r depende directamente del valor de B_0 . El vector M realiza un movimiento de giro sobre la dirección del campo magnético a la frecuencia de la radiación absorbida. El ángulo de inclinación α depende, entre otros factores, de la duración de la emisión. Normalmente es de microsegundos, por lo que hablamos de *pulsos de radiofrecuencia*. La importancia de un pulso se constata por el valor de α que consigue (pulso de 90° , pulso de 180° , etc.). Las imágenes de RM se obtienen enviando pulsos de RF de diversos valores, separados a intervalos de tiempo adecuados, lo que constituye las *secuencias de pulsos*.

Después de enviar un pulso de α , los núcleos de H van a liberar el exceso energético que han absorbido de la RF mediante la relajación energética, proceso en el que la magnetización del voxel vuelve a su posición de equilibrio alineada con B_0 . Esta variación de posición representa una variación magnética que induce sobre la antena receptora una corriente eléctrica que servirá para realizar la imagen.

Estudiando la señal de relajación podemos obtener, para cada vóxel, información relacionada con su densidad de núcleos de H e información relacionada con el entorno bioquímico en el que los núcleos de H se encuentran. Mediante la programación de secuencias de pulsos adecuadas podemos hacer prevalecer una u otra información, lo que se describe como *potenciación de la imagen*.

SECUENCIAS DE PULSOS

En cualquier imagen tomográfica por RMN, aparte del valor básico de la densidad D del vóxel, existe en mayor o menor grado la influencia de los parámetros de relajación. Mediante el uso de *secuencias de pulsos* podemos hacer que prevalezca uno de estos parámetros en el contraste de la imagen, lo que hemos llamado *potenciar la imagen* en un parámetro determinado. Estas secuencias de pulsos consisten en módulos básicos formados por pulsos de RF de valores concretos, separados a intervalos de tiempo adecuados. Estos módulos se repiten a lo largo de la obtención de la imagen con un *tiempo de repetición* (TR).

Una secuencia básica en la obtención de imágenes es la “*secuencia saturación-recuperación*” (SR) que consiste en enviar pulsos de 90° separados por un tiempo de repetición (TR) suficientemente largo para que la magnetización se restablezca. Esto nos permite obtener imágenes “*potenciadas en densidad, D*”, en las que la intensidad de la imagen es directamente proporcional a la densidad de núcleos de hidrógeno de cada vóxel.

La “*secuencia inversión-recuperación*” (IR) consiste en enviar módulos constituidos por dos pulsos distintos : un pulso inversor de 180° y, después de dejar relajar durante un cierto tiempo (“*tiempo de inversión*” TI), sin dejar que se recupere la magnetización, enviar un pulso de 90° . Esta secuencia permite relacionar la imagen con la movilidad y el tipo de molécula de la que forma parte el H, puesto que identifica la mayor o menor facilidad de estos núcleos para liberar energía, es decir, su relación con el medio (tiempo de spin-medio,

spin-látex o T₁). El H en una molécula grasa tiene facilidad de liberar energía (T₁ corto), mientras que en una molécula de agua libre tiene dificultad en hacerlo (T₁ largo). La intensidad de la señal es inversamente proporcional al valor de T₁ y directamente proporcional a la facilidad de la relajación energética. Así, la grasa aparece hiperintensa mientras que los líquidos en reposo aparecen en negro y las imágenes obtenidas se denominan "*imágenes potenciadas en T₁*".

La secuencia más utilizada en la potenciación de imagen es la denominada "*secuencia spin-echo*" (SE). Consisten en enviar un pulso de 90°, dejar un tiempo de relajación, durante el cual los espines se desfasan al relajarse de forma diferente, y enviar un nuevo pulso de 180°, recogiendo la señal una vez transcurrido un tiempo. De esta forma, la señal se recoge a modo de eco del primer pulso respecto al de 180°. El tiempo entre el tiempo inicial de 90° y la recogida de la señal se llama TE. Este módulo se repite cada TR. Al ir repitiendo el proceso, obtenemos multitud de ecos. Cada uno de estos ecos tiene un TE más largo.

El valor del campo magnético percibido por cada núcleo del vóxel depende del entorno bioquímico en que se encuentra ya que todas las cargas eléctricas de su alrededor modifican el valor del campo magnético externo. Esta influencia del entorno se conoce como *interacción spin-spin*. Si el vóxel estuviera aislado (interacción spin-spin nula) sus núcleos percibirían sólo el campo magnético externo creado por el imán y se relajarían al mismo tiempo (relajación sincrónica o coherente). Al contrario, si los H del vóxel pertenecen a radicales químicos distintos, los campos localmente percibidos son ligeramente distintos y liberan energía en frecuencias distintas, originándose una relajación

asincrónica o incoherente. El sincronismo en la relajación da idea de la estructuración molecular dentro del vóxel. A mayor coherencia en la relajación, mayor señal procede de la imagen, proporcional a T2 y traduce menor influencia entre las estructuras, mayor desestructuración.

La ventaja de esta secuencia SE es que permite corregir las heterogeneidades del campo magnético puesto que la variación de intensidad que se recoge es sólo debida a las influencias spin-spin y no a las heterogeneidades del campo magnético. Esto permite tener *"imágenes potenciadas en T2"*.

En las imágenes obtenidas mediante las secuencias de pulsos se puede establecer, como norma general :

- una imagen con TE corto, TR corto está potenciada en T1
- una imagen con TE largo, TR largo está potenciada en T2

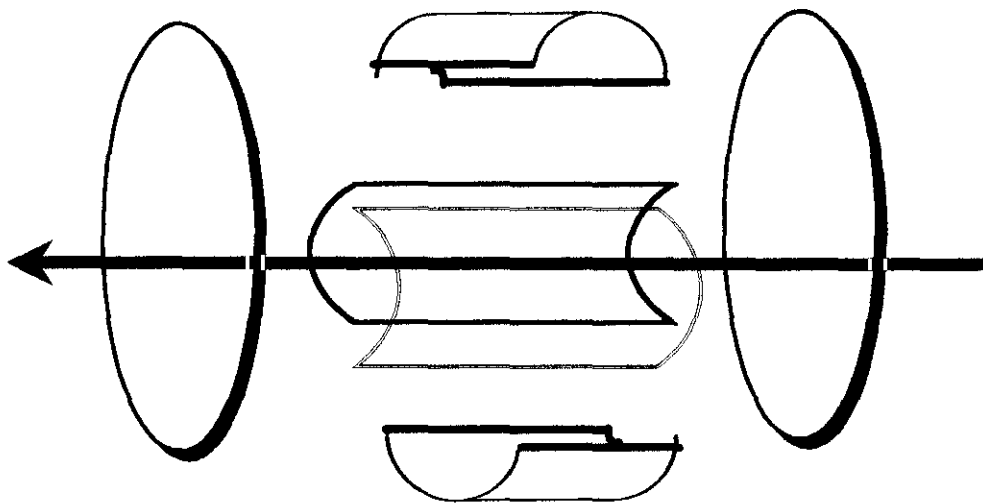
GRADIENTE DE CAMPO MAGNETICO

Un gradiente magnético es una variación lineal del valor del campo magnético en una dirección.

Hemos visto que la frecuencia de resonancia es directamente proporcional al campo magnético que percibe el núcleo. Por lo tanto, basta con que los núcleos de H del plano deseado perciban el mismo campo magnético y éste sea distinto del resto. Para lograr este objetivo se utilizan los *gradientes de campo magnético*. La misión de los gradientes de campo magnético es modificar el campo B_0 de forma que la señal emitida en un punto dependa de su posición en el espacio. En la práctica, estos gradientes están producidos por

electroimanes que modifican de una forma lineal el campo B_0 en las tres direcciones del espacio. Producen una variación uniforme del campo magnético según la dirección perpendicular a los planos elegidos. Su valor varía según los aparatos entre 0,05 y 1 gauss/cm y condiciona el espesor mínimo del corte y la resolución espacial. Estos gradientes no funcionan de forma permanente, sino que son conmutados rápidamente durante las secuencias de adquisición, por ello se habla normalmente de *"pulsos de gradiente"*.

FIG.39.

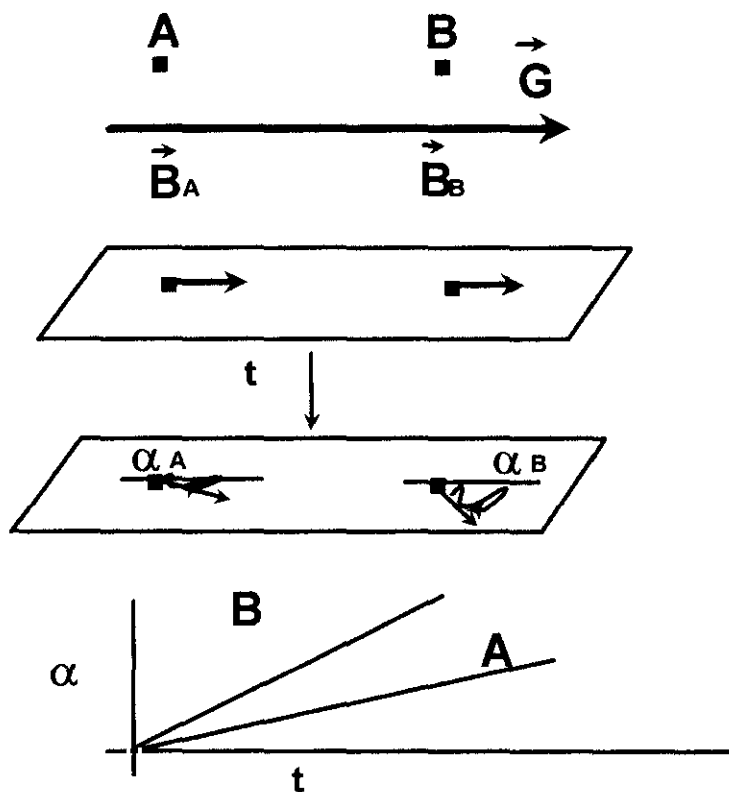


Bobinas de gradiente.

Los tres pares de bobinas están colocadas generalmente sobre un cilindro, llamado cilindro de gradientes, dentro del cual se coloca al paciente o muestra a analizar.

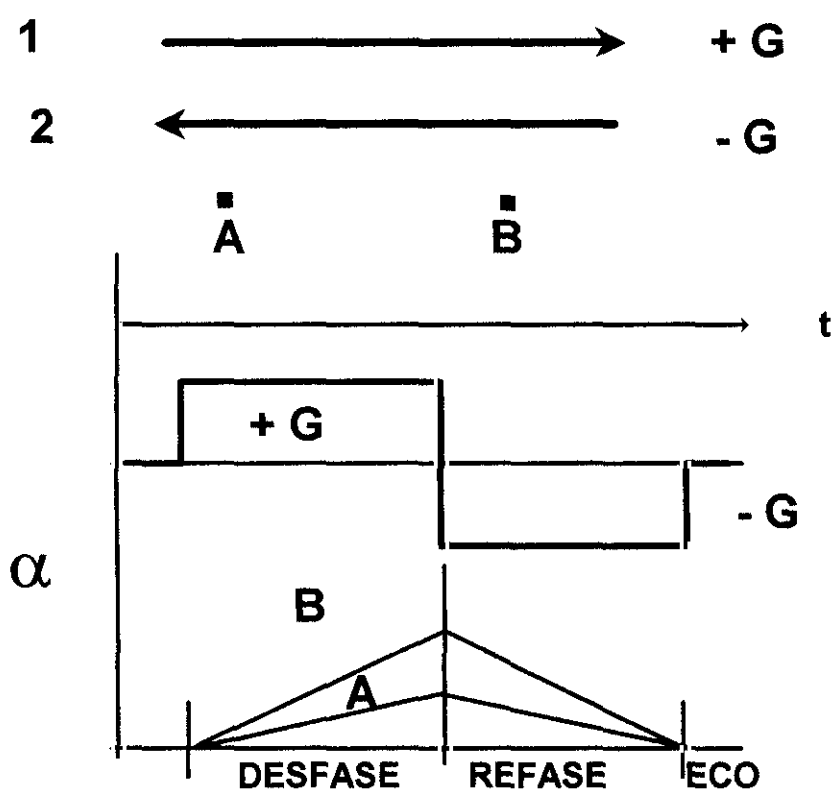
Cuando se establece un gradiente magnético durante un tiempo t , los núcleos sometidos a un campo mayor se relajan a una mayor frecuencia y por tanto, sus espines se adelantan respecto a los núcleos bajo campos magnéticos menores. Se produce un “*defase*” entre los espines, y esto se denomina “*gradiente defase*”. Si transcurrido un tiempo sustituimos este gradiente por otro igual en valor pero en sentido contrario (“*gradiente de refase*”) se produce el efecto contrario y si dejamos transcurrir el mismo tiempo t , los espines estarán de nuevo en fase, obteniéndose un eco que llamamos *eco de gradiente*.

FIG. 40.



Supongamos dos núcleos A y B, separados y sometidos a un gradiente G, de manera que el campo magnético sobre B es mayor que sobre A. Aunque sobre el plano transversal sus proyecciones están orientadas en la misma dirección, a medida que pasa el tiempo, el ángulo que forma B (α_B) respecto a la posición inicial es mayor que α_A . El desfase en el plano transversal α aumenta con el tiempo.

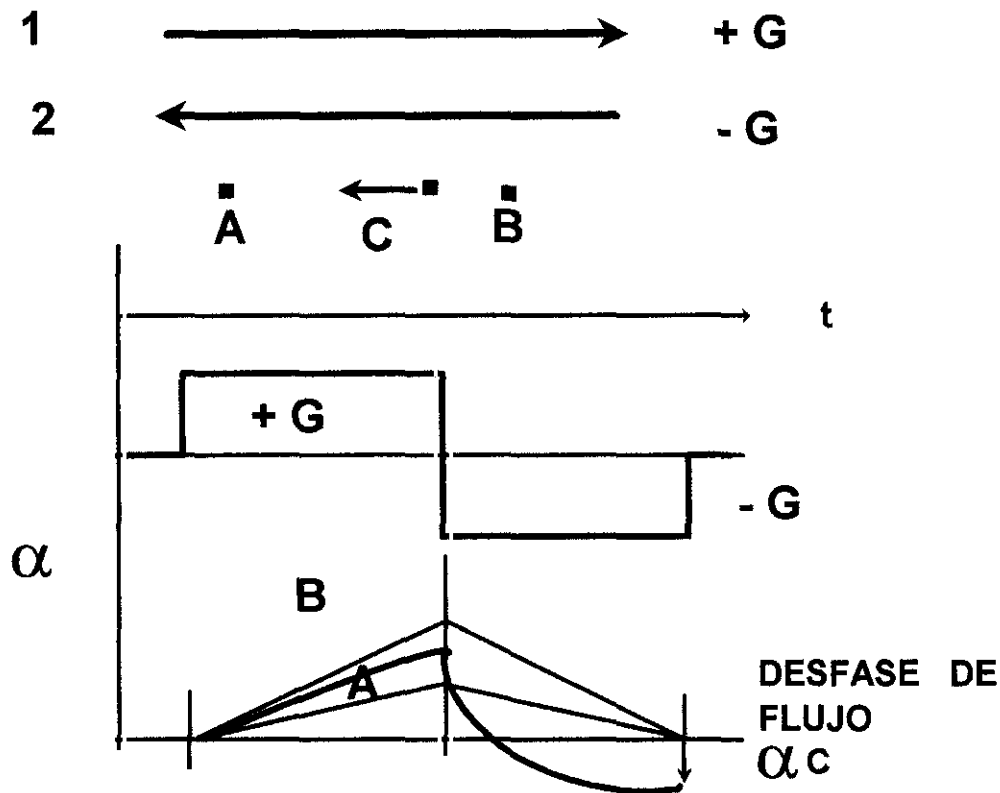
FIG.41.



La aplicación de una inversión de gradiente +G y -G constituye un *gradiente bipolar*. Después de un gradiente bipolar, los espines estacionarios se encuentran en fase. Si un núcleo es móvil y se mueve de A a B, al cambiar el valor del campo magnético que percibe a lo largo de su trayectoria, no logra al llegar a B refasarse con los espines estacionarios y por tanto, acumula un desfase que es proporcional a la velocidad con que se mueve, al valor del

gradiente y al tiempo de aplicación. Fijados G y t , el desfase entre los espines móviles y los espines estacionarios es proporcional a la velocidad con que se mueven los espines móviles.

FIG. 42.



El establecimiento de un gradiente magnético implica que existe una variación de frecuencias en el vóxel. Por tanto, cada vóxel vendrá determinado por una frecuencia de resonancia media y un intervalo de frecuencias centrado alrededor de ella. Cuando enviamos el pulso excitador, éste lleva implícito una amplitud de banda alrededor de la frecuencia principal. La amplitud del pulso excitador determina el tamaño del vóxel y, por tanto, lo que denominamos "grosor del plano de corte".

Otra de las grandes ventajas que ha aportado la IRM es la obtención de imágenes tomográficas en cualquier dirección del espacio, con campos de visión variables y situados en cualquier punto del organismo. Ello es debido a la selectividad del fenómeno de resonancia y a la aplicación de los gradientes de selección de plano. Al estar éstos activados durante tan poco tiempo, permiten que durante la relajación del plano y dentro del tiempo TR de la secuencia puedan ser activados otros planos, con lo que nos encontramos con una técnica multiplanar y a su vez, multidireccional dentro de una misma adquisición.

Además de esta ventaja, la IRM permite realizar tomografías con dimensiones ajustadas a las zonas a explorar, lo que se conoce como “*FOV variable o campo de visión variable*”.

SECUENCIAS RAPIDAS

En las secuencias SE, el tiempo de adquisición (t) viene dado por :

$$t = DM \times TR \times NA$$

Siendo : DM, la dimensión de fase de la matriz de obtención, en general entre 128 y 256; NA, el número de adquisiciones necesarias para aumentar el cociente señal/ruido a fin de obtener una buena imagen; y TR, el tiempo de repetición de la secuencia.

Las secuencias rápidas se caracterizan por utilizar pulsos iniciales más cortos y sustituir el pulso de 180° y obtener la señal de eco mediante un juego de gradientes magnéticos.

A las secuencias con un α -pulso inicial y un eco de gradiente se las denomina “*secuencias gradiente-eco*” (GE). En ellas, el valor del TE continúa siendo el tiempo entre el pulso inicial y la recogida de ecos del gradiente. La

obtención de la señal de eco mediante una inversión de gradientes (gradiente bipolar ; defase y refase) permite la recogida de la señal con TE muy cortos, con lo que también los tiempos TR pueden ser más cortos.

Resumiendo, la imagen de RMN se obtiene mediante una adecuada combinación de pulsos de radiofrecuencia y pulsos de gradiente. Los pulsos de radiofrecuencia se precisan para la excitación selectiva del plano y la obtención de un eco en las secuencias SE, mientras que los pulsos de gradiente intervienen en la selección del plano, en la codificación por frecuencia y por fase y en la obtención del eco en secuencias GE. Todo ello tiene que estar perfectamente sincronizado ya que la planificación de los tiempos de eco, el ángulo de pulso inicial y el valor de TR fijarán la potenciación de la imagen.

Esquemáticamente

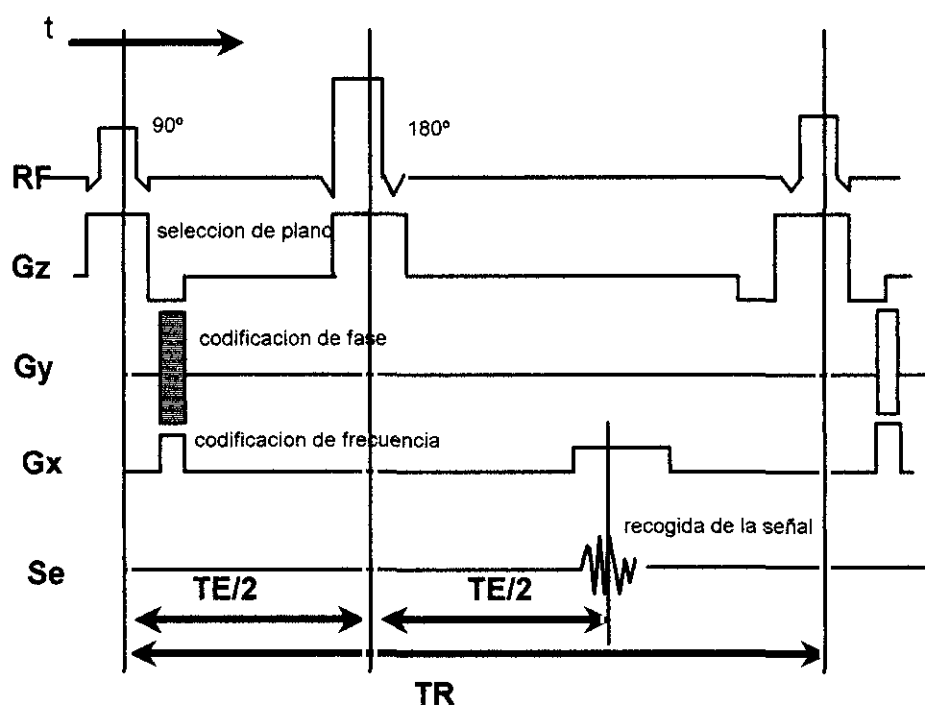


FIG. 43.

La resonancia magnética de imagen a resolución microscópica es una técnica no invasiva que se utiliza de forma específica en el estudio de los

materiales biológicos espacialmente heterogéneos (CALLAGHAN, 1991 ; BLÜMICH Y KUHN, 1992). El estudio de muestras biológicas como el cartílago con esta técnica está justificado por varias características : la señal de IRM es muy sensible a la cantidad y estado de moléculas líquidas o de comportamiento semejante a líquidos, que son abundantes en los especímenes biológicos ; los métodos de gradiente de campos pulsátiles se pueden utilizar para medir la variación espacial de los coeficientes de autodifusión (D) en la muestra. Además, los tiempos de relajación T_1 y T_2 se determinan mediante el movimiento molecular, y por tanto, reflejan el estado dinámico de los alrededores. Consecuentemente, la IRM puede dar lugar a mapas, no sólo del contenido acuoso de las muestras, sino también de la variación espacial de parámetros moleculares como T_1 , T_2 o D con una resolución del orden de 10 micras.

ABRIR PRINCIPIO DE LA... ESPECTROSCOPIA...

